

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-205487

⑬ Int. Cl.

C 12 N 15/00  
A 61 K 35/74  
37/04

識別記号

庁内整理番号

7115-4B  
7138-4C  
7138-4C

⑭ 公開 昭和61年(1986)9月11日

※審査請求 未請求 発明の数 8 (全44頁)

⑮ 発明の名称 ヒトタンパクC活性の発現ベクター

⑯ 特 願 昭61-26665

⑰ 出 願 昭61(1986)2月7日

優先権主張 ⑱ 1985年2月8日 ⑲ 米国(US) ⑳ 699967

㉑ 発 明 者 ニルス・ウルリック・ アメリカ合衆国インディアナ46220、インディアナポリ  
バング ス、イースト・セブンティファースト・ストリート706番  
㉒ 発 明 者 ロバート・ジョン・ベ アメリカ合衆国インディアナ46254、インディアナポリ  
ツクマン ス、スタンスバリー・コート4655番  
㉓ 出 願 人 イーライ・リリー・ア アメリカ合衆国46285インディアナ州、インディアナポリ  
ンド・カンパニー ス市、リリー・コーポレート・センター(番地の表示な  
し)

㉔ 代 理 人 弁理士 青 山 葆  
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

ヒトタンパクC活性の発現ベクター

2. 特許請求の範囲

1. ヒトプロテインC活性を有するポリペプチド  
をコードしている二本鎖デオキシリボ核酸であつ  
て、その暗号鎖が式：

5'-R<sub>N</sub><sup>1</sup>-R<sub>M</sub>-GCC AAC TCC TTC CTG

GAG GAG CTC CGT CAC AGC AGC CTG  
GAG CGG GAG TGC ATA GAG GAG ATC  
TGT GAC TTC GAG GAG GCC AAG GAA  
ATT TTC CAA AAT GTG GAT GAC ACA  
CTG GCC TTC TGG TCC AAG CAC GTC  
GAC GGT GAC CAG TGC TTG GTC TTG  
CCC TTC GAG CAC CCG TGC GCC AGC  
CTG TGC TGC GGG CAC GGC ACG TGC  
ATC GAC GGC ATC GGC AGC TTC AGC  
TGC GAC TGC CGC AGC GGC TGG GAG  
GGC CGC TTC TGC CAG CGC GAG GTC  
AGC TTC CTC AAT TGC TCG CTG GAC

AAC GGC GGC TGC ACG CAT TAC TGC  
CTA GAG GAG GTG GGC TGG CGG CGC  
TGT AGC TGT GCG CCT GGC TAC AAG  
CTG GGG GAC CAC CTC CTG CAG TGT  
CAC CCC GCA GTG AAG TTC CCT TGT  
GGG AGG CCC TGG AAG CGG ATG GAG  
AAG AAG CGC AGT CAC CTG AAA CGA  
GAC ACA GAA GAC CAA GAA GAC CAA  
GTA GAT CCG CGG CTC ATT GAT GGG  
AAG ATG ACC AGG CGG GGA GAC AGC  
CCC TGG CAG GTG GTC CTG CTG GAC  
TCA AAG AAG AAG CTG GCC TGC CGG  
GCA GTG CTC ATC CAC CCC TCC TGG  
GTG CTG ACA GCG GCC CAC TGC ATG  
GAT GAG TCC AAG AAG CTC CTT GTC  
AGG CTT GGA GAG TAT GAC CTG CCG  
CGC TGG GAG AAG TCG GAG CTG GAC  
CTG GAC ATC AAG GAG GTC TTC GTC  
CAC CCC AAC TAC AGC AAG AGC ACC  
ACC GAC AAT GAC ATC GCA CTG CTG

CAC CTG GCC CAG CCC GCC ACC CTC  
 TCG CAG ACC ATA GTG CCC ATC TGC  
 CTC CCG GAC AGC GGC CTT GCA GAG  
 CGC GAG CTC AAT CAG GCC GGC CAG  
 GAG ACC CTC GTG ACG GGC TGG GGC  
 TAC CAC AGC AGC CGA GAG AAG GAG  
 GCC AAG AGA AAC CGC ACC TTC GTC  
 CTC AAC TTC ATC AAG ATT CCC GTG  
 GTC CCG CAC AAT GAG TGC AGC GAG  
 GTC ATG AGC AAC ATG GTG TCT GAG  
 AAC ATG CTG TGT GCG GGC ATC CTC  
 GGG GAC CGG CAG GAT GCC TGC GAG  
 GGC GAC AGT GGG GGG CCC ATG GTC  
 GCC TCC TTC CAC GGC ACC TGG TTC  
 CTG GTG GGC CTC GTG AGC TGG GGT  
 GAG GGC TGT GGG CTC CTT CAC AAC  
 TAC GGC GTT TAC ACC AAA GTC AGC  
 CCC TAC CTC GAC TGG ATC CAT GGG  
 CAC ATC AGA GAC AAG GAA GCC CCC  
 CAG AAG AGC TGG GCA CCT TAG-3'

または1を表わす。ただし、Mが0であるときにはNも0であり；Rが式：

5'-GCC CAC CAG GTG CTG CGG ATC  
 CGC AAA CGT-3'

で示される配列を有するときにはR<sup>1</sup>は式：

5'-ATG TGG CAG CTC ACA AGC CTC  
 CTG CTG TTC GTG GCC ACC TGG  
 GGA ATT TCC GGC ACA CCA GCT  
 CCT CTT GAC TCA GTG TTC TCC  
 AGC AGC GAG CGT-3'

で示される配列を有し；さらに、Rが式：

5'-CAC CAG GTG CTG CGG ATC CGC  
 AAA CGT-3'

で示される配列を有するときには、R<sup>1</sup>は式：

5'-ATG TGG CAG CTC ACA AGC CTC  
 CTG CTG TTC GTG GCC ACC TGG  
 GGA ATT TCC GGC ACA CCA GCT  
 CCT CTT GAC TCA GTG TTC TCC  
 AGC AGC GAG CGT GCC-3'

で示される配列を有する。)

(式中、Aはデオキシアデニル、Gはデオキシグアニル、Cはデオキシシチジル、Tはチミジルを表わし、

Rは式：

5'-GCC CAC CAG GTG CTG CGG ATC  
 CGC AAA CGT-3' または  
 5'-CAC CAG GTG CTG CGG ATC CGC  
 AAA CGT-3'

R<sup>1</sup>は式：

5'-ATG TGG CAG CTC ACA AGC CTC  
 CTG CTG TTC GTG GCC ACC TGG  
 GGA ATT TCC GGC ACA CCA GCT  
 CCT CTT GAC TCA GTG TTC TCC  
 AGC AGC GAG CGT-3' または  
 5'-ATG TGG CAG CTC ACA AGC CTC  
 CTG CTG TTC GTG GCC ACC TGG  
 GGA ATT TCC GGC ACA CCA GCT  
 CCT CTT GAC TCA GTG TTC TCC  
 AGC AGC GAG CGT GCC-3'

で示される配列を有し、Mは0または1、Nは0

で示される二本鎖デオキシリボ核酸。

2.第1項記載のDNAを含有しているプラスミド。

3.プラスミドpHC7,pSV2-HCP8,pMSV-HPC,pL133,pL132,pL151,pL141,pL142,pMMT△BPV-HPCまたはpCZ460である第2項記載のプラスミド。

4.真核性宿主細胞内でヒトプロテインC活性を有するポリペプチドを生産する方法であつて：

A、真核性宿主細胞を、組換えDNAベクターであつて：

I)該宿主内における該ベクターの自律的な複製または染色体への組込みを司るDNA配列；

II)該宿主内で機能的なプロモーターおよび翻訳活性化配列；および、

III)該プロモーターおよび翻訳活性化配列を伴なっている転写および翻訳解読相内に位置している第1項に記載のDNA化合物；

を含有するベクター(ただし、Nが1の場合は、翻訳活性化配列は翻訳開始コドンにコードしてい

ない)によつて形質転換し:次いで、

B、工程Aで形質転換された宿主細胞を遺伝子の発現に適した条件下において培養することを特徴とする方法。

5.宿主細胞が、HepG-2、ネツタイシマ蚊、CV-1、LLC-MK<sub>2</sub>、3T3、CHO-K1、CHO-K1(dhfr<sup>-</sup>)、アンセラエア・オイカリプティ、HeLa、RPMI8226、H4IIEC3、C127IまたはHS-スルタン細胞である第4項記載の方法。

6.形質転換された宿主細胞が、プラスミドpL133、pSV2-HPC8またはpL142で形質転換されたHepG-2、ネツタイシマ蚊、C127I、LLC-MK<sub>2</sub>、3T3またはH4IIEC3細胞である第5項記載の方法。

7.組換えDNAベクターが、さらに該真核性宿主細胞内で機能的な選択マーカーをも含有している第4項または第5項記載の方法。

8.形質転換された細胞が、プラスミドpL132、pL151、pL141、pMSV-HPCまたはpMMTΔBPV-HPCで形質転換された、HepG-2、

訳活性化配列;および、

Ⅲ)該プロモーターおよび翻訳活性化配列を伴っている転写および翻訳読取相内に位置している第1項記載のDNA化合物(ただし、Nは0であつてMは0または1である);および

Ⅳ)選択マーカー;

を含有するベクターによつて形質転換し:次いで、

B、該原核性宿主細胞を遺伝子の発現に適した条件下において培養することを特徴とする方法。

11.原核性宿主細胞がバチルス、ストレプトマイセス、または大腸菌である第10項記載の方法。

12.宿主細胞が大腸菌K12である第11項記載の方法。

13.宿主細胞が大腸菌K12 RV308、MM294、RR1またはRR1ΔM15である第12項記載の方法。

14.プラスミドpCZ460で形質転換された大腸菌細胞。

15.大腸菌K12である第14項記載の細胞。

16.大腸菌K12 RV308、MM294、RR1また

ネツタイシマ蚊、CV-1、LLC-MK<sub>2</sub>、3T3、CHO-K1、CHO-K1(dhfr<sup>-</sup>)、アンセラエア・オイカリプティ、HeLa、RPMI8226、H4IIEC3、C127I、またはHS-スルタン細胞である第7項記載の方法。

9.プラスミドpSV2-HPC8、pMSV-HPC、pL133、pL132、pL151、pL141、pL142、またはpMMTΔBPV-HPCで形質転換されたHepG-2、ネツタイシマ蚊、CV-1、LLC-MK<sub>2</sub>、3T3、CHO-K1、CHO-K1(dhfr<sup>-</sup>)、アンセラエア・オイカリプティ、HeLa、RPMI8226、H4IIEC3、C127I、またはHS-スルタン細胞である真核性宿主細胞。

10.原核性宿主細胞内でヒトプロテインC活性を有するポリペプチドを生産する方法であつて:

A、原核性宿主細胞を、組換えDNAベクターであつて:

Ⅰ)該宿主内における該ベクターの自律的な複製または染色体への組込みを司るDNA配列;

Ⅱ)該宿主内で機能的なプロモーターおよび翻

はRR1ΔM15である第15項記載の細胞。

17.第4~8項または第10~13項のいずれかに記載の方法によつて生産されたヒトプロテインC活性を有するポリペプチドの治療有効量を担体と共に含有している組成物。

18.非経口投与に適した第17項記載の組成物。

19.血管系の異常の予防また治療に用いるための、ヒトプロテインC活性を有するポリペプチド。

20.プロテインC欠損に係る血管系の異常、深部静脈血栓症、肺動脈血栓症、末梢動脈血栓症、伝染性血管内凝血、心臓または末梢動脈で生じた塞栓、急性心筋梗塞症、血栓性発作あるいは侵入性がんに伴うフィブリンの析出の予防または治療に用いられる第19項記載のポリペプチド。

### 3.発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は、ヒトプロテインC活性をコードしているDNA化合物および組換えDNAクローニングベクターに関するものである。本発明のベクターによれば、真核性または原核性宿主細胞のいず

れにおいても、この新規なDNA化合物を発現させることができる。本発明はまた、これらのクローニングベクターで形質転換された宿主細胞に関するものである。本発明に係る形質転換宿主細胞は、ヒトプロテインCまたはその前駆体、誘導体あるいはサブフラグメントを発現する。本発明に係るDNAの多くは、これまで、自然界においても、また実験室においても合成されたことのないプロテインC誘導体の合成に利用し得るものである。

#### 発明の構成並びに目的

ビタミンK依存性の血漿タンパクであるプロテインCは、生理学的に非常に重要なタンパク質である。おそらく、プロテインCは、他のタンパク質と一緒に、血栓症の誘因である、血液凝固(凝血)に対する最も重要なダウンレギュレーター(降下調整剤、down regulator)として作用すると思われる。換言すると、プロテインC酵素系は、抗凝血作用に関する主要な生理学的機構に係っている。

ヒトプロテインCは肝臓で生合成され、血漿中に存在している。セリンプロテアーゼ(セリン分解酵素)前駆体(酵素原)である。プロテインCの生物学的な活性が完全に発現されるためには、ビタミンK要求性の翻訳後(ポスト-トランスレーション)修飾がなされる必要がある。ジスルフィド結合を有する二本鎖の成熟プロテインC酵素原は、一本鎖前駆体の制限的タンパク分解によって生成される。この制限的タンパク分解には、肝臓からの新生(形成途上にある)ポリペプチドが分泌される間に、～33アミノ酸残基からなるシグナルペプチド(下記の残基1～33)の開裂(切断)、～9アミノ酸残基からなるプロペプチド(残基34～42)の除去、並びに残基198および199の除去が起こることによって酵素原中に認められる二本鎖が形成される過程が含まれていると考えられる。酵素原が活性化されて活性なセリンプロテアーゼになる過程には、ARG-LEUペプチド結合(残基211および212)のタンパク分解的な開裂が含まれる。この開裂により、

プロテインCの生物学的な重要性および潜在的な治療上の重要性は、臨床上の所見から推察される。先天性のホモ接合体性プロテインC欠損症の場合には、罹患した家族において、幼児期早期における急激な紫斑病(しばしば致死的な播種性の血管内凝固の型をとる)による死亡がみられる。ヘテロ接合体性のプロテインC欠損症の場合には、罹患した人々は重篤な、再発性の血栓塞栓症に苦しむことになる。B型血友病または第Ⅱ因子欠損症の治療のための血液濃縮物であつて、不純物としてプロテインCを含んでいるものは、ヘテロ接合体性プロテインC欠損症に有効であると同時に、ホモ接合体性の血管内凝血を阻止し、治療するのにも有効であるということが臨床で、十分に確立されている。

また、血栓塞栓症、あるいは、血栓塞栓症に至る前置的な病的状態、即ち、播種性血管内凝固(凝血)、大けが、大手術を受けた状態、およびがん等の状態にある場合にも、プロテインCレベルが異常に低くなるということが分っている。

2本鎖分子の大きい方の鎖のアミノ末端を構成するドデカペプチド(残基200～211)が放出される。プロテインCは著しくグリコシル化されており、成熟酵素は～23%の炭水化物を含有している。また、プロテインCは $\alpha$ -カルボキシグルタミン酸や $\beta$ -ヒドロキシアスパラギン酸等の多くの一般的でないアミノ酸をも含んでいる。 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸(gla)は、コファクターとしてビタミンKを必要とする、肝ミクロソームのカルボキシラーゼによって、グルタミン酸残基から産生される。通常、原核生物は、組換え遺伝子から発現されたタンパク質をグリコシル化、 $\alpha$ -カルボキシ化あるいは $\beta$ -ヒドロキシグリコシル化しないので、通常のプロテインCの翻訳後修飾があまり多くなされていない形のプロテインC誘導体の合成を初めて可能にした、という点で本発明は意義深いものといえる。これらの特異な誘導体は、以下に詳しく述べる様に、極めて大きい研究的価値と臨床上の価値を有している。

本明細書中に開示した発明の目的に沿って、下

記の如く、用語を定義する。

ApR:アンピシリン耐性表現型またはアンピシリン耐性(表現型)を付与する遺伝子。

e p:  $\epsilon$ -抗原(F)遺伝子のSV40初期プロモーター、 $\epsilon$ -抗原結合部位、およびSV40複製起源からなるDNAセグメント。

機能的ポリペプチド:回収可能な、生物学的に活性なヘテロローガス(異質の)またはホモローガス(同質の)ポリペプチドまたは前駆体、ヘテロローガス・ポリペプチドとホモローガス・ポリペプチドの一部または全体とからなる、回収可能な生物活性ポリペプチド、あるいは、ヘテロローガス・ポリペプチドと、特異的に開裂され得る生物学的に不活性なポリペプチドからなる回収可能な生物学的に不活性な融合ポリペプチド。

G418R:G418耐性表現型またはG418耐性を付与する遺伝子。これは、KmRと同意義に用いられる。

IVS:イントロンをコードしているDNA、介在配列とも称される。

るものではない。

組換えDNA発現ベクター:プロモーターが挿入されている組換えDNAクローニングベクター。

レプリコン:プラスミドまたはその他のベクターの自律的な複製をコントロールすると共に、その様な複製を行わせるDNA配列。

制限フラグメント:1またはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼ酵素の作用によつて生成された全ての線状DNA配列。

RSV LTR:ラウス肉腫(Rous Sarcoma)ウイルスの長い末端重複のプロモーター活性を含有しているDNA配列。

感受性宿主細胞:特定の抗生物質または他の毒性化合物に対する耐性を付与するDNAセグメントの存在なしには、これらの存在下で増殖することができない宿主細胞。

構造遺伝子:機能的ポリペプチドをコードしているあらゆるDNA配列であつて、翻訳開始シグナルおよび翻訳停止シグナルをも包含する。

TcR:テトラサイクリン耐性表現型またはテ

MSV LTR:ネズミ肉腫ウイルスの長い末端重複(terminal repeat)のプロモーター活性を含有しているDNAセグメント。

新生(形成途上にある)タンパク質:mRNA転写物の翻訳によつて生産されたポリペプチドであつて、まだ、如何なる翻訳後修飾もなされていない段階のポリペプチド。

pA:ポリアデニル化シグナルをコードしているDNA配列。

プロモーター:DNAのRNAへの転写を指令するDNA配列。

プロテインC活性:ヒトプロテインCの生物学的機能、および抗-ヒトプロテインC抗体と結合活性に関与する、ヒトプロテインCのあらゆる性質を指す。

組換えDNAクローニングベクター:1またはそれ以上の付加的なDNAセグメントを付加され得る、または既に付加されたDNA分子からなる、自律的に複製可能なあらゆる物質を指し、プラスミドおよびファージを含むが、これらに限定され

ラサイクリン耐性を付与する遺伝子。

形質転換:受容宿主細胞にDNAを導入することであつて、その結果、受容細胞の遺伝型に変化をもたらすこと。

形質転換体:形質転換を受けた受容宿主細胞。

翻訳活性化配列:リボソーム結合部位および5'-ATG-3'の如き翻訳開始コドンを含むDNA配列であつて、mRNA転写物のペプチドまたはポリペプチドへの翻訳に与る、あらゆるDNA配列。

酵素原:タンパク分解酵素の酵素活性を持たない前駆体。

#### 図面についての簡単な記述

第1図-プラスミドpHC7の制限サイトおよび機能地図。

第2図-プラスミドpSV2-HPC8の制限部位および機能地図。

第3図-プラスミドpL133の制限サイトおよび機能地図。

第4図-プラスミドpL132の制限サイトおよび機能地図。

第5図 - プラスミド pL141 の制限サイトおよび機能地図。

第6図 - プラスミド pL142 の制限サイトおよび機能地図。

第7図 - プラスミド pMSV-HPC の制限サイトおよび機能地図。

第8図 - プラスミド pMMT△BPV-HPC の制限サイトおよび機能地図。

第9図 - プラスミド pL151 の制限サイトおよび機能地図。

第10図 - プラスミド pCZ101 の制限サイトおよび機能地図。

第11図 - プラスミド pCZ10 の制限サイトおよび機能地図。

第12図 - pCZ459 の制限サイトおよび機能地図。

本発明はヒトプロテインC活性を有するポリペプチドをコードしている、組換えDNAベクター類に関するものである。便宜上、本発明ベクターの暗号鎖だけを示すと、それらベクターは以下の

式で示される配列を有する：

5'-R<sub>N</sub><sup>1</sup>-R<sub>M</sub>-GCC AAC TCC TTC CTG  
GAG GAG CTC CGT CAC AGC AGC CTG  
GAG CGG GAG TGC ATA GAG GAG ATC  
TGT GAC TTC GAG GAG GCC AAG GAA  
ATT TTC CAA AAT GTG GAT GAC ACA  
CTG GCC TTC TGG TCC AAG CAC GTC  
GAC GGT GAC CAG TGC TTG GTC TTG  
CCC TTG GAG CAC CCG TGC GCC AGC  
CTG TGC TGC GGG CAC GCC ACG TGC  
ATC GAC GGC ATC GGC AGC TTC AGC  
TGC GAC TGC CGC AGC GGC TGG GAG  
GGC CGC TTC TGC CAG CGC GAG GTG  
AGC TTC CTC AAT TGC TCG CTG GAC  
AAC GGC GGC TGC ACG CAT TAC TGC  
CTA GAG GAG GTG GGC TGG CGG CGC  
TGT AGC TGT GCG CCT GGC TAC AAG  
CTG GGG GAC GAC CTC CTG CAG TGT  
CAC CCC GCA GTG AAG TTC CCT TGT  
GGG AGC CCC TGG AAG CGG ATG GAG

AAG AAG CGC AGT CAC CTG AAA CGA  
GAC ACA GAA GAC CAA GAA GAC CAA  
GTA GAT CCG CGG CTC ATT GAT GGG  
AAG ATG ACC ACG CGG GGA GAC AGC  
CCC TGG CAG GTG GTC CTG CTG GAC  
TCA AAG AAG AAG CTG GCC TGC GGG  
GCA GTG CTC ATC CAC CCC TCC TGG  
GTG CTG ACA GCG GCC CAC TGC ATG  
GAT GAG TCC AAG AAG CTC CTT GTC  
AGG CTT GGA GAG TAT GAC CTG CGG  
CGC TGG GAG AAG TGG GAG CTG GAC  
CTG GAC ATC AAG GAG GTC TTC GTC  
CAC CCC AAC TAC AGC AAG AGC ACC  
ACC GAC AAT GAC ATC GCA CTG CTG  
CAC CTG GCC CAG CCC GCC ACC CTC  
TCG CAG ACC ATA GTG CCC ATC TGC  
CTC CCG GAC AGC GGC CTT GCA GAG  
CGC GAG CTC AAT CAG GCC GGC CAG  
GAG ACC CTC GTG ACG GGC TGG GGC  
TAC CAC AGC AGC CGA GAG AAG GAG

GCC AAG AGA AAC CGC ACC TTC GTC  
CTC AAC TTC ATC AAG ATT CCC GTG  
GTC CCG CAC AAT GAG TGC AGC GAG  
GTC ATG AGC AAC ATG GTG TCT GAG  
AAC ATG CTG TGT GCG GGC ATC CTC  
GGG GAC CGG CAG GAT GCC TGC GAG  
GGC GAC AGT GGG GGG CCC ATG GTC  
GCC TCC TTC CAC GGC ACC TGG TTC  
CTG GTG GGC CTG GTG AGC TGG GGT  
GAG GGC TGT GGG CTC CTT CAC AAC  
TAC GGC GTT TAC ACC AAA GTC AGC  
CGC TAC CTC GAC TGG ATC CAT GGG  
CAC ATC AGA GAC AAG GAA GCC CCC  
CAG AAG AGC TGG GCA CCT TAG-3'

(式中、Aはデオキシアデニル、Gはデオキシグアニル、Cはデオキシシチジル、Tはチミジルを表わし、

Rは式：

5'-GCC CAC CAG GTG CTG CGG ATC  
CGC AAA CGT-3'または

5'-CAC CAG GTG CTG CGG ATC CGC  
AAA CGT-3'

R<sup>1</sup>は式：

5'-ATG TGG CAG CTC ACA AGC CTC  
CTG CTG TTC GTG GCC ACC TGG  
GGA ATT TCC GGC ACA CCA GCT  
CCT CTT GAC TCA GTG TTC TCC  
AGC AGC GAG CGT-3' または

5'-ATG TGG CAG CTC ACA AGC CTC  
CTG CTG TTC GTG GCC ACC TGG  
GGA ATT TCC GGC ACA CCA GCT  
CCT CTT GAC TCA GTG TTC TCC  
AGC AGC GAG CGT GCC-3'

で示される配列を有し、Mは0または1、Nは0  
または1を表わす。ただし、Mが0であるときに  
はNも0であり；Rが式：

5'-GCC CAC CAG GTG CTG CGG ATC  
CGC AAA CGT-3'

で示される配列を有するときにはR<sup>1</sup>は式：

5'-ATG TGG CAG CTC ACA AGC CTC

(D)該ベクターの、宿主内での自律的な複製ま  
たは染色体への組込みを与えるDNA配列  
からなる複数のDNA配列をライゲート(結合)  
させることにより調製される。

本発明はまた、真核性宿主細胞内で、ヒトプロ  
テインC活性を持つているポリペプチドを生産す  
る方法であつて：

A. 転写および翻訳活性化配列が転写および翻  
訳解読相内に位置している、上記変法の(B)に従  
つて調製された組換えDNAベクター(ただし、  
Nが1の場合、翻訳活性化配列は翻訳開始コドン  
をコードしていない)によつて真核性宿主細胞を  
形質転換し；次いで、

B. 工程Aで形質転換された宿主細胞を遺伝子  
の発現に適した条件下において培養することから  
なる方法を提供するものである。この方法の一つ  
の実施態様では、組換えDNAベクターは、選択  
可能なマーカーを含有している。

本発明はまた、原核性宿主細胞内で、ヒトプロ  
テインC活性を有するポリペプチドを生産する方

CTG CTG TTC GTG GCC ACC TGG  
GGA ATT TCC GGC ACA CCA GCT  
CCT CTT GAC TCA GTG TTC TCC  
AGC AGC GAG CGT-3'

で示される配列を有し；さらに、Rが式：

5'-CAC CAG GTG CTG CGG ATC CGC  
AAA CGT-3'

で示される配列を有するときには、R<sup>1</sup>は式：

5'-ATG TGG CAG CTC ACA AGC CTC  
CTG CTG TTC GTG GCC ACC TGG  
GGA ATT TCC GGC ACA CCA GCT  
CCT CTT GAC TCA GTG TTC TCC  
AGC AGC GAG CGT GCC-3'

で示される配列を有する。)

本発明の組換えDNAベクターは、相互に

(A)暗号鎖

(B)真核性の転写および翻訳活性化配列；また  
は、

(C)原核性の転写および翻訳活性化配列；並び  
に、

法であつて、別法(C)に従つて調製されたベク  
ター(ただし、Nは0であつて、Mは0または1で  
あり、しかも、選択マーカーを含有している)を  
用いる点においてのみ上記の方法と異なる方法を  
提供するものである。

本発明ベクターはヒトプロテインCをコードし  
ており、MおよびNが1の場合には、これまで知  
られていなかった新生ヒトプロテインCのアミノ  
酸配列をコードしている。以後の記述を容易にす  
るために、新生ヒトプロテインCのアミノ酸配列  
に番号を付して示すと、該配列は式：

H <sub>2</sub> N-MET	TRP	GLN	LEU	5	THR	SER	LEU
LEU	10						
LEU	PHE	VAL	ALA	THR	TRP	15	GLY
^							
ILE	SER	GLY	THR	20	PRO	ALA	PRO
LEU	ASP	25	SER	VAL	PHE	SER	SER
30							
SER	GLU	ARG	ALA	HIS	GLN	35	VAL
LEU	ARG	ILE	40	ARG	LYS	ARG	ALA

ASN<sup>45</sup> SER PHE LEU GLU GLU<sup>50</sup> LEU  
 ARG HIS SER SER<sup>55</sup> LEU GLU ARG  
 GLU CYS<sup>60</sup> ILE GLU GLU ILE CYS  
 ASP<sup>65</sup> PHE GLU GLU ALA<sup>70</sup> LYS GLU  
 ILE PHE GLN<sup>75</sup> ASN VAL ASP ASP  
 THR<sup>80</sup> LEU ALA PHE TRP SER<sup>85</sup> LYS  
 HIS VAL ASP GLY<sup>90</sup> ASP GLN CYS  
 LEU VAL<sup>95</sup> LEU PRO LEU GLU HIS  
 PRO<sup>100</sup> CYS ALA SER LEU<sup>105</sup> CYS CYS  
 GLY HIS GLY<sup>110</sup> THR CYS ILE ASP  
 GLY<sup>115</sup> ILE GLY SER PHE SER<sup>120</sup> CYS  
 ASP CYS ARG SER<sup>125</sup> GLY TRP GLU  
 GLY ARG<sup>130</sup> PHE CYS GLN ARG GLU  
  
 GLN VAL VAL LEU<sup>230</sup> LEU ASP SER  
 LYS LYS<sup>235</sup> LYS LEU ALA CYS GLY  
 ALA<sup>240</sup> VAL LEU ILE HIS<sup>245</sup> PRO SER  
 TRP VAL LEU<sup>250</sup> THR ALA ALA HIS  
 CYS<sup>255</sup> MET ASP GLU SER LYS<sup>260</sup> LYS  
 LEU LEU VAL ARG<sup>265</sup> LEU GLY GLU  
 TYR ASP<sup>270</sup> LEU ARG ARG TRP GLU  
 LYS<sup>275</sup> TRP GLU LEU ASP<sup>280</sup> LEU ASP  
 ILE LYS GLU<sup>285</sup> VAL PHE VAL HIS  
 PRO<sup>290</sup> ASN TYR SER LYS SER<sup>295</sup> THR  
 THR ASP ASN ASP<sup>300</sup> ILE ALA LEU  
 LEU HIS<sup>305</sup> LEU ALA GLN PRO ALA  
 THR<sup>310</sup> LEU SER GLN THR<sup>315</sup> ILE VAL

VAL<sup>135</sup> SER PHE LEU ASN<sup>140</sup> CYS SER  
 LEU ASP ASN<sup>145</sup> GLY GLY CYS THR  
 HIS<sup>150</sup> TYR CYS LEU GLU GLU<sup>155</sup> VAL  
 GLY TRP ARG ARG<sup>160</sup> CYS SER CYS  
 ALA PRO<sup>165</sup> GLY TYR LYS LEU GLY  
 ASP<sup>170</sup> ASP LEU LEU GLN<sup>175</sup> CYS HIS  
 PRO ALA VAL<sup>180</sup> LYS PHE PRO CYS  
 GLY<sup>185</sup> ARG PRO TRP LYS ARG<sup>190</sup> MET  
 GLU LYS LYS ARG<sup>195</sup> SER HIS LEU  
 LYS ARG<sup>200</sup> ASP THR GLU ASP GLN  
 GLU<sup>205</sup> ASP GLN VAL ASP<sup>210</sup> PRO ARG  
 LEU ILE ASP<sup>215</sup> GLY LYS MET THR  
 ARG<sup>220</sup> ARG GLY ASP SER PRO<sup>225</sup> TRP  
  
 PRO ILE CYS<sup>320</sup> LEU PRO ASP SER  
 GLY<sup>325</sup> LEU ALA GLU ARG GLU<sup>330</sup> LEU  
 ASN GLN ALA GLY<sup>335</sup> GLN GLU THR  
 LEU VAL<sup>340</sup> THR GLY TRP GLY TYR  
 HIS<sup>345</sup> SER SER ARG GLU<sup>350</sup> LYS GLU  
 ALA LYS ARG<sup>355</sup> ASN ARG THR PHE  
 VAL<sup>360</sup> LEU ASN PHE ILE LYS<sup>365</sup> ILE  
 PRO VAL VAL PRO<sup>370</sup> HIS ASN GLU  
 CYS SER<sup>375</sup> GLU VAL MET SER ASN  
 MET<sup>380</sup> VAL SER GLU ASN<sup>385</sup> MET LEU  
 CYS ALA GLY<sup>390</sup> ILE LEU GLY ASP  
 ARG<sup>395</sup> GLN ASP ALA CYS GLU<sup>400</sup> GLY  
 ASP SER GLY GLY<sup>405</sup> PRO MET VAL



ALA SER PHE<sup>410</sup> HIS GLY THR TRP  
 415 PHE LEU VAL GLY LEU VAL SER  
 TRP GLY GLU<sup>425</sup> GLY CYS GLY LEU  
 LEU<sup>430</sup> HIS ASN TYR GLY VAL<sup>435</sup> TYR  
 THR LYS VAL SER<sup>440</sup> ARG TYR LEU  
 ASP TRP<sup>445</sup> ILE HIS GLY HIS ILE  
 450 ARG ASP LYS GLU ALA<sup>455</sup> PRO GLN  
 LYS SER TRP<sup>460</sup> ALA PRO-COOH

(式中、H<sub>2</sub>N はアミノ末端、-COOHはカルボキシ末端、ALAはアラニン、ARGはアルギニン、ASNはアスパラギン、ASPはアスパラギン酸、CYSはシステイン、GLNはグルタミン、GLUはグルタミン酸、GLYはグリシン、HISはヒスチジン、ILEはイソロイシン、LEUはロイシン、LYSはリシン、METはメチオニン、PHEはフェニルアラニン、PROは

5'- C TGC AGG GGG GGG GGG GGG  
 GGG GGG CTG TCA TGG CGG  
 CAG GAC GGC GAA CTT GCA  
 GTA TCT CCA CGA CCC GCC  
 CCT ACA GGT GCC AGT GCC  
 TCC AGA-3'

および

5'- CGA CCC TCC CTG CAG GGC TGG  
 GCT TTT GCA TGG CAA TGG ATG  
 GGACCAT TAA AGG GAC ATG TAA  
 CAA GCA CAC CCC CCC CCC CCC  
 CCC CCC CCC CCT GCA G-3'

(式中、Aはデオキシアデニル、Gはデオキシグアニル、Cはデオキシシチジル、そしてTはチミジルを表わす)

で示される付加的な配列を、新生期のヒトプロテインC暗号配列の暗号鎖の5'および3'末端にそれぞれ有している。DNA塩基対形成における相補性から、2本鎖DNA分子の鎖の内、1方の鎖の配列があればそれと対向する鎖の配列は十分決定

プロリン、SERはセリン、THRはスレオニン、TRPはトリプトファン、TYRはチロシン、そしてVALはバリンを表わす)

で示される。

本発明のDNA化合物は、ヒトプロテインC活性をコードしているヒト肝臓mRNAから調製されたcDNAクローンから導かれる。cDNAクローン(類)を組立てるために、プロテインCをコードしているcDNAの末端に、5'ポリG配列、3'ポリC配列、並びに5'および3'の両側におけるPst I制限酵素認識配列を組立てた。これらcDNAクローンの内、2個を操作し、新生期のヒトプロテインCの暗号配列と、その暗号領域の5'および3'末端に位置する、非翻訳mRNAをコードしているDNA部分との両方を含むDNA分子を組立てた。このDNA分子をプラスミドpBR322のPst I部位に挿入し、プラスミドpHC7を組立てた。従つて、プラスミドpHC7は、前記の暗号配列(MとNの両方が1である配列)、並びに、これも分子を1本鎖だけで示すと、式：

できる。プラスミドpHC7は、ノーザン・リージョナル・リサーチ・ラボラトリイ(NRRL, Northern Regional Research Laboratory)、ベオリア、イリノイスに寄託され、そのパーマネント・ストック・カルチャー・コレクションの一部となつている菌株、大腸菌(E. coli) K12 RR1/pHC7から常法通り単離できる。大腸菌K12 RR1/pHC7の培養物は、NRRLから、寄託番号NRRL B-15926の下に入手可能である。プラスミドpHC7の制限サイトおよび機能地図を添付の第1図に示す。

上記の如く、プロテインC活性をコードしているDNAを含んでいる様々な組換えDNA発現ベクターを組立てた。本発明のベクター類は2つのタイプ：真核性、殊に、哺乳類宿主細胞を形質転換する様、計画されたもの、並びに大腸菌を形質転換する様、計画されたもの、に分けられる。本明細書で例示した真核性または哺乳類ベクターで大腸菌を形質転換することもできるが、これらのプラスミド中に存在している、プロテインC活性

の暗号DNAの転写のための真核性プロモーターは、大腸菌内では効率よく機能しない。

本発明に係る、新生ヒトプロテインCをコードしているDNA化合物は、哺乳類およびその他の真核性宿主細胞を形質転換し、さらに、それら細胞内でプロテインC活性を発現させるのに、特に好適である。多くの哺乳類宿主細胞は、新生ヒトプロテインCのアミノ末端に存在しているシグナルペプチドを認識し、適切にプロセッシングするために必要な細胞機構を有している。ある種の哺乳類宿主細胞は、血漿中に存在するヒトプロテインCに認められる如く、グリコシル化、 $\alpha$ -カルボキシル化、および $\beta$ -ヒドロキシル化等の翻訳後修飾をも行うことができる。広範囲に及ぶ様々な真核性宿主細胞の形質転換のためのベクターがあり、以下に例示する特定のベクターは決して、本発明の範囲を制限することを意図したものではない。

pSV2-型(タイプ)のベクターは、一定の真核性転写単位--プロモーター(ep)、介在配

ドpSV2-gpt上に存在している大腸菌のキサンチン-グアノシン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼを表わしている。プラスミドpSV2-HPC8は、まず最初、プラスミドpHC7由来の、新生プロテインCの暗号配列のアミノ末端から $\frac{1}{2}$ の配列と1個の合成リンカーとを含むHind III-Apa I制限フラグメントを調製し；次いで、プラスミドpHC7由来の、新生プロテインCの暗号配列のカルボキシル末端から $\frac{1}{2}$ の配列と1個の合成リンカーとを含むApa I-Bgl II制限フラグメントを調製し；これら2個のフラグメントをHind III-Bgl II-開裂プラスミドpSV2-gptに挿入することにより、組立てられた。プラスミドpSV2-HPC8の詳しい組立て方法を実施例2に記載し、該プラスミドの制限サイトおよび機能地図を添付の第2図に示した。

プラスミドpSV2-HPC8を、プラスミドpSV2- $\beta$ -グロビン(NRRL B-15928)と一緒に、プラスミドpL133の組立てにおける出発物質として用いた。新生プロテインCの全暗号領域を含

列(IVS)、およびポリアデニル化(PA)部位を構成しているSV40ゲノムセグメントを含んでいる。SV40-抗原が存在しない場合には、プラスミドpSV2-型ベクターは哺乳類およびその他の真核性細胞の染色体性DNAに組込まれることによつて宿主細胞を形質転換する。挿入遺伝子の転写がSV40プロモーターによつて行われる種々のプラスミドpSV2-型ベクター類、即ち、pSV2-gpt、pSV2-neo、pSV2-dhfr、およびpSV2- $\beta$ -グロブリンが組立てられている。これらのベクターはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC、American Type Culture Collection、ロックビレ、メリーランド(Rockville Maryland))またはノーザン・リージョナル・リサーチ・ラボラトリイ(ベオリア、イリノイス)のいずれかから入手可能である。

プラスミドpSV2-HPC8はプラスミドpSV2-gpt(ATCC 37145)、プラスミドpHC7、および2個の合成リンカーから導かれる本発明のベクターである。「gpt」という語句は、プラスミ

ドpSV2-HPC8の2つの制限フラグメント、~0.29 kb Hind III-Sal Iフラグメントおよび~1.15 kb Sal I-Bgl IIフラグメントを、Hind III-Bgl II-開裂プラスミドpSV2- $\beta$ -グロビンにライゲートした。得られたプラスミド(pL133と命名)は、 $\beta$ -グロビン暗号領域が全て、新生プロテインCの暗号領域で置き換えられたものであつた。プラスミドpL133の詳しい組立て方法を実施例3に示し、該プラスミドの制限サイトおよび機能地図を添付の第3図に示した。

プラスミドpL132は、プラスミドpSV2-HPC8のHind III-Sal IおよびSal I-Bgl II制限フラグメントをプラスミドpSV2-neo(ATCC 37149)に挿入したことを除き、プラスミドpL133の組立て法と類似の方法で組立てられた。「neo」という語句は、プラスミド中にネオマイシン耐性付与遺伝子(これはG418耐性をも付与する)が存在していることを表わす。その組立てについては実施例4に記載されているが、これは

多シストロンを産生する。新生のプロテインCおよびG 418 耐性付与暗号配列の両者は、同一のSV 40 初期プロモーターによつて開始されるポリシストロン性mRNA として転写される。G 418 は大多数の真核性、その他の宿主細胞にとつて有毒であるため、プラスミドpL 132 形質転換体をG 418 耐性についてスクリーニングすることによつて選択することができる。プラスミドpL 132 の制限サイトおよび機能地図を添付の第4 図に示す。

プラスミドpSV 2 - dhfr ( ATCC 37146 ) はSV 40 初期プロモーターのコントロール下にあるネズミのジヒドロ葉酸還元酵素 ( dhfr ) を含有している。適当な条件下において、このdhfr 遺伝子は宿主の染色体内で増幅され、あるいは、コピーされることが知られている。この増幅によつて、dhfr 遺伝子と極めて近接しているDNA 配列が含まれてくることがある。プラスミドpL 141 は、SV 40 初期プロモーターのコントロール下にある、dhfr 遺伝子と、新生プロテインC構造遺伝子の両者を含有している本発明のベクターであ

い。その他のプロモーター類、例えば、SV 40 後期プロモーターまたは、例えば、エストロゲン誘導性の、ニワトリのオボアルブミン遺伝子、インターフェロン遺伝子、グルココルチコイド誘導性のチロシンアミノトランスフェラーゼ遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、主な初期および後期アデノウイルス遺伝子等の真核性遺伝子からのプロモーターも、真核性宿主細胞内でプロテインCを生産するために計画された組換えDNA 発現ベクター中に使用するために、容易に単離し、修飾することができる。また、プロテインCを発現させるために、真核性プロモーター類を直列に並べて用いてもよい。さらに、広範囲の真核性宿主細胞に感染する多くのレトロウイルスが知られている。レトロウイルスDNA の長い末端重複 ( ロング・ターミナル・リピート ) はしばしばプロモーター活性をコードしており、これを、ヒトプロテインCの発現を駆動させる目的で、SV 40 初期プロモーターの代りに用いることができる。

プラスミドpRSV cat ( ATCC 37152 ) は、ニ

る。

プラスミドpL 141 を組立てるには、プラスミドpSV 2 - dhfr 上の単一のBamHI 部位をXho I 部位に変換してプラスミドpSV 2 - dhfr - X を得る。新生プロテインC構造遺伝子を含有している、プラスミドpL 133 の2 つのフラグメント、~ 0.64 kb Pvu II - Bst E II フラグメントと~ 2.7 kb Bst E II - EcoR I フラグメントを単離し、まずPvu II - Bst E II フラグメントをXho I - Bst E II フラグメントに変換し、次いで、EcoR I - Xho I - 開裂プラスミドpSV 2 - dhfr - X にライゲートした。得られたプラスミド ( pL 141 と命名 ) を添付の第5 図に示し、その組立て法を実施例5 に述べる。

哺乳類その他の真核性宿主細胞内でプロテインC活性を発現するために組立てられた本発明の例示プラスミドにおいて、SV 40 初期プロモーター以外のプロモーターをも用いることができる。本発明は、本明細書中に例示した特定の真核性プロモーターの使用に限定されるものでは、決してな

ワトリその他の宿主細胞に感染することが知られているラウス肉腫ウイルス ( RSV ) の長い末端重複部分を含んでいる。このRSV の長い末端重複配列は、プラスミドpRSV cat の~ 0.76 kb Nde I - Hind III 制限フラグメントとして単離することができる。このRSV の長い末端重複に含まれるプロモーター [ ゴーマン ( Gorman ) ら、1982、P.N.A.S. 79 : 6777 ] を、プラスミドpL 133 の~ 5.1 kb Nde I - Hind III フラグメントにクローンすると、SV 40 初期プロモーターと置き換わり、新生ヒトプロテインC構造遺伝子の転写と発現を駆動するのに適正な位置をとる。得られたプラスミド ( pL 142 と命名 ) を添付の第6 図に示す。プラスミドpL 142 の組立てを実施例6 に記載する。

本発明に係るもう1 つのプラスミドは、プロテインCの発現を駆動するために、ラウス肉腫ウイルスの長い末端重複のプロモーターを用い、また、選択および遺伝子の増幅のためにdhfr 遺伝子を含有している。このプラスミド ( pL 151 と命名 )

は、プラスミド pSV2-dhfr-X の～4.2 kb EcoRI-XhoI 制限フラグメントをプラスミド pL142 の～1.06 kb BstEII-NdeI 制限フラグメント、およびプラスミド pL133 の～2.74 kb BstEII-EcoRI 制限フラグメントにライゲートすることにより、組立てられた。ライゲーションとプラスミド pL151 の組立てを達成するために、ライゲーションに用いた pL142 制限フラグメントの NdeI 部位を、DNA リンカーを付加することにより、XhoI 部位に変換した。プラスミド pL151 の組立てを以下の実施例 9 に記載し、該プラスミドの制限サイトおよび機能地図を添付の第 9 図に示す。

プラスミド pMSVi (NRRLB-15929) は、マウス等の宿主細胞に感染するウイルスとして知られているネズミ肉腫ウイルス (MSV) の長い末端重複 (LTR) を含有している。プラスミド pSV2-HPC8 の～1.4 kb BclI 制限フラグメントをプラスミド pMSVi の単一の BglII 制限酵素認識配列にクローニングすることにより、新生

メントをライゲートした。得られたプラスミド (pMMTΔBPV-HPC と命名) は、MMT プロモーターの下で転写および発現が行われる位置に、新生プロテイン C 構造遺伝子を含有している。プラスミド pMMTΔBPV-HPC 内の、新生プロテイン C 構造遺伝子のすぐ下流に隣接して、メタロチオネインプロモーターによつてコントロールされ、プラスミド pMMTΔBPV-HPC で形質転換された宿主の選択を可能ならしめる、G418 耐性-付与遺伝子が存在している。プラスミド pMMTΔBPV-HPC の組立ては実施例 8 に記載されており、該プラスミドの制限サイトおよび機能地図は、添付の第 8 図に示されている。

上記のベクター類 (プラスミド pHC7 を除く) は、様々な真核性 (殊に哺乳類) 宿主細胞に導入 (トランスフォーム) 可能であり、それらの内で発現し得る。プラスミド pSV2-HPC8、pL142 および pL133 は安定な形質転換体を単離、同定するための選択マーカーを有していないので、これらのベクター類は、以下の実施例 12 に示す

プロテイン C 構造遺伝子を MSV の長い末端重複のプロモーターのコントロール下に置く。得られたプラスミド (pMSV-HPC と命名) を添付の第 7 図に示した。プラスミド pMSV-HPC の組立ては、実施例 7 に記載されている。

マウスのメタロチオネイン (MMT) プロモーターも真核性宿主細胞内で使用するために、十分に特性化されている。この MMT プロモーターは、本発明に係る別のプラスミド (pMMTΔBPV-HPC と命名されている) の組立てにおける出発物質である、15 kb プラスミド pdBPV-MMTneo (ATCC 37224) 内に存在している。プラスミド pMMTΔBPV-HPC を組立てるには、まず、プラスミド pdBPV-MMTneo を BamHI で消化し、次いで、再ライゲートし、プラスミド pMMTΔBPV を形成する。この BamHI 欠失により、ウシ乳頭腫ウイルス (BPV) DNA の～8 kb が除去される。次いで、プラスミド pMMTΔBPV を BglII で消化し、この BglII-消化プラスミドに、プラスミド pSV2-HPC8 の～1.4 kb BclI 制限フラグ

如く、過渡的な段階でのアッセイに、あるいは、同時形質転換を目的とする場合に、最も有用なベクターである。通常、大腸菌内でプラスミド DNA を調製する方が、他の宿主生物内で調製するよりも効率的であるので、これらのベクター類はすべて (プラスミド pHC7 を含む)、大腸菌内で複製され得る配列を含有している。

上記のベクター類に含まれている新生ヒトプロテイン C 構造遺伝子は、この新生ヒトプロテイン C 構造遺伝子と関連する特定のプロモーターが機能する宿主細胞内で発現する。SV40 初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスの長い末端重複プロモーター、ネズミの肉腫ウイルスの長い末端重複プロモーター、並びにマウスのメタロチオネインプロモーターは、広範囲に及ぶ様々な宿主細胞内で機能する。プラスミド pSV2-HPC8、pL133、pL132、pL151、pL141、pMSV-HPC、pMMTΔBPV-HPC および pL142 に、とつて好ましい宿主細胞を、適当な注を添えて表 I に示す。

表 I (つづき)

宿主細胞	起 源	供給源	注
C127I	マウス線維芽細胞	ATCC No CRL1616	
HS-スルタン (Sultan)	ヒト形質細胞の形質細胞	ATCC No CRL1484	
※アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、12301パークローン・ドライブ、 ロックスビレ、メアリーランド20852-41776 (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776)			

表 I プラスミドpSV2-HPC8、pL133、pL132、pL151、pL141、  
pMSV-HPC、pMMT△BPV-HPCおよびpL142によって好ましい宿主細胞

宿主細胞	起 源	供給源	注
HepG-2	ヒト肝臓の肝芽腫	※ATCC No HB 8065	米国特許第4,393,133号にこのセルラインの使用に関する記載がある。
ネツタイシマ蚊 蚊の幼虫 (Aedes aegypti)		ATCC No CCL125	
CV-1	アフリカ緑ザル腎臓	ATCC No CCL70	
LLC-MK <sub>2</sub> (本来のもの) Monkey 腎臓	カニクイザル(Rhesus)	ATCC No CCL7	
LLC-MK <sub>2</sub> (誘導体)	カニクイザル腎臓	ATCC No CCL7.1	ATCC No CCL7 よりも生長が早い

表 I (つづき)

宿主細胞	起 源	供給源	注
3T3	マウス胎児線維芽細胞	ATCC No CCL92	
CHO-K1	チャイニーズ・ハムスター 卵巣	ATCC No CCL61	プロリン要求性。この宿主から、dhfr <sup>-</sup> 誘導体DXB11の如き、CHO-K1の誘導体が得られる。
アンセラエ・ オйкаリプティ (Anthelaea eucalypti)	蛾の卵巣組織	ATCC No CCL80	
HeLa	ヒト子宮頸部の上皮様細胞	ATCC No CCL2	
RPMI 8226	ヒト骨髄腫	ATCC No CCL155	IgG ラムダ-タイプ軽鎖分泌性
H411EC3	ラット肝腫瘍	ATCC No CRL1600	この宿主から、8-アザグアニン耐性 FAZA 宿主細胞等の誘導体を得られる。

本発明において好ましい形質転換体は、

HepG-2/pL132, HepG-2/pMSV-HPC,  
HepG-2/pL141, HepG-2/pL151,  
HepG-2/pMMT△BPV-HPC, H411EC3/  
pL141, H411EC3/pL132, H411EC3/  
pMMT△BPV-HPC, H411EC3/pMSV-HPC,  
H411EC3/pL151, LLC-MK<sub>2</sub>/pL132,  
LLC-MK<sub>2</sub>/pMMT△BPV-HPC, LLC-MK<sub>2</sub>/  
pL141, LLC-MK<sub>2</sub>/pL151, C127I/  
pMMT△BPV-HPC, C127I/pMSV-HPC,  
C127I/pL151, 3T3/pMSV-HPC, 3T3/  
pMMT△BPV-HPC, 3T3/pL132, 3T3/pL141,  
3T3/pL151, RPMI8226/pMSV-HPC,  
RPMI8226/pMMT△BPV-HPC, RPMI8226/  
pL132, RPMI8226/pL141, RPMI8226/  
pL151, CHO-K1/pMSV-HPC, CHO-K1/  
pMMT△BPV-HPC, CHO-K1/pL132,  
CHO-K1/pL141, CHO-K1/pL151, CHO-K1-  
(dhfr<sup>-</sup>)/pMSV-HPC, CHO-K1(dhfr<sup>-</sup>)  
/pMMT△BPV-HPC, CHO-K1(dhfr<sup>-</sup>) /

pL132, CHO-K1(dhfr<sup>-</sup>)/pL141, および CHO-K1(dhfr<sup>-</sup>)/pL151 である。

本発明のDNA化合物は、例えば、大腸菌、枯草菌(Bacillus)およびストレプトマイセス等の原核性宿主細胞内でも発現し得る。通常、原核性宿主細胞は組換え遺伝子から製造された哺乳類タンパク質を、グリコシル化、 $\gamma$ -カルボキシル化または $\beta$ -ヒドロキシル化しないので、原核性宿主細胞内で本発明のプロテインC活性をコードしているDNAを発現させることにより、種々の、新規なヒトプロテインC誘導体を生産することができる。原核性宿主細胞内で発現された新規なプロテインC誘導体は様々な程度のプロテインC活性を示し、従つて、これを翻訳後修飾の研究に用いることができる。

これらの新規な誘導体はまた、プロテインC-特異抗体の産生を刺激するための抗原として用いることができ、あるいは、プロテインCの測定にも用いることができる。多くの測定法においては、試料中のタンパク質レベルを測定するのに競合的

れていない。本発明は、(1)新生ヒトプロテインC構造遺伝子中の、ヒトプロテインCの「gla-領域」であるアミノ酸残基1~83をコードしているDNAを欠失させ、この欠失されたDNAを真核性(または原核性)宿主細胞内で発現させるか；あるいは(2)新生ヒトプロテインCの構造遺伝子、あるいはそのサブフラグメントまたは誘導体を、組換え法によつて生産されたヒトプロテインCを $\gamma$ -カルボキシル化しない大腸菌、またはその他の適当な原核性宿主細胞内で発現させる、という異つた2つの方法によつてgla-減少プロテインCを生産することに関するものである。

本発明に係る、プロテインC活性をコードしているDNA化合物を原核性宿主細胞内で発現させる前に、真核性のシグナルペプチドをコードしているDNAを除去した。理論上、新生ヒトプロテインCのアミノ末端における最初の33アミノ酸残基が、プロテインCの肝臓から血流中への分泌を促すシグナルペプチドとしての作用を有する。本発明は、真核性宿主細胞内でプロテインC活性

な抗体結合を利用する。即ち、放射活性(またはそれ以外の方法で)標識した、原核生物-産生ヒトプロテインCを、血漿中のプロテインCの測定における「競合的な分子(competiting molecule)」として用いることができる。当該技術分野の人々ならば、その様な測定が、入院患者または外来患者に対するプロテインCを含む治療法の治療期間中において、さらには、凝固障害を有する患者の診断のために、必須であるということを容易に理解するであろう。

さらに、ヒトプロテインCの抗凝固活性は、このタンパク質から $\gamma$ -カルボキシル化されたグルタミン酸残基を除去することにより、プロテインCのプロフィブリノリティック活性から分離することができる。活性化されたヒトプロテインCは、軽鎖のアミノ末端に集まっている幾つかの $\gamma$ -カルボキシル化グルタミン酸(gla)残基を含有しており、これらの残基を除去すると、抗凝固活性は破壊されるが、得られた「gla-減少」プロテインCのプロフィブリノリティック活性は破壊さ

を発現させるために特定の真核性シグナルペプチドを用いることに限定されるものではない。一般則として、原核生物は有効に真核性シグナルペプチドをプロセッシングしない；従つて、新生ヒトプロテインC構造遺伝子のシグナルペプチドをコードしている部分を原核生物内で発現させることは、幾分、非能率的であろう。本明細書中では特に例示していないが、本発明は、原核生物内でプロテインCを発現させ、分泌させることを目的とする、<sup>プロテインC活性の暗号DNAと</sup>原核性シグナルペプチドの暗号DNAとの融合物をも包含するものである。

上記の如く、新生ヒトプロテインCの1~33アミノ酸残基は、細胞外分泌のための「シグナル」をコードしていると思われ、活性なプロテインC中には存在していない。ヒトプロテインCのプロペプチドを構成している、新生ヒトプロテインCの残基34~42もまた、このタンパク質のプロセッシングおよび活性化の間に除去され、それらは、該分子の正しい折りたたみと修飾に寄与していると考えられている。新生ヒトプロテインCの

残基33～42は以下に例示する原核性発現ベクター中にコードされているが、本発明は、新生ヒトプロテインCの、残基33を含まない、残基34～42をコードしている原核性発現ベクターをも包含するものである。

しかしながら、本発明は、特定のプロテインC誘導体の発現に限定されるものではない。本発明のDNAは、新生プロテインCのアミノ酸残基1～42または1～83をコードしている部分を欠失し、その結果、誘導体を発現させる様、容易に修飾することができる。さらに、活性なヒトプロテインCの軽鎖または重鎖を発現させるベクターを組立てるために本発明化合物を操作して活性なヒトプロテインC重鎖(アミノ酸残基212～461)と、活性なヒトプロテインC軽鎖(アミノ酸残基43～197)とを分離することは容易である。この様にして、真核性または原核性の適当な宿主内で2本の鎖を別々に生産し、次いで、化学的に再結合することにより、活性なヒトプロテインCを合成することができる。

ミノ酸残基200～461または212～461を含む重鎖分子と再結合させると、その結果、活性なプロテインC誘導体、あるいは、残基33～42または34～42、および200～211を含むペプチドが切断される(その様な切断は、ヒトの循環系で自然に起こる)ことによつて活性化されるプロテインC誘導体が生産される。

プラスミドpCZ460は、プロテインC活性を大腸菌内で発現させるために組立てられた本発明プラスミドである。プラスミドpCZ460は、プラスミドpCZ101、プラスミドpHC7、および様々なDNAリンカー類から組立てられた。プラスミドpCZ101はスコナーらにより、記載されている〔Schoner et. al., (1984) プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス USA 81 5403～5407〕。pCZ101の制限サイトおよび機能地図を添付の第10図に示す。

実施例10に記載の如く、様々な操作を介して、合成XbaI-NdeIリンカーをプラスミドpCZ

新生ヒトプロテインCのアミノ酸残基1～42、198および199に関する上記のタンパク分解のプロセッシングに加えて、プロテインC酵素原の活性化はアミノ酸残基200～211の除去をも含む。このプロセッシングは、天然ではインビボ(生体内)、より特異的には、血流内で起きていると考えられている。活性化の過程において種々の有用なプロテインC誘導体が存在しており、本発明の組換えDNA発現ベクターは、その内のどれをコードしていてもよい。その様なベクターによつて不活性な形のヒトプロテインCを組換え生産することができ、ヒトの循環系内で、あるいは実施例15の方法に従つて活性化することができる。

また、ヒトプロテインCの軽鎖と重鎖とを別個に生産し、次いで化学的に再結合する方法を、他の、種々の有用なヒトプロテインC誘導体の生成に利用することができる。例えば、新生ヒトプロテインCのアミノ酸残基33～197、34～197または43～197を含む軽鎖分子を生産し、次いで、これと、新生ヒトプロテインCのア

101のlppプロモーターの下流に導入した。得られたプラスミド(pCZ11と命名)に、メチオニル残基と新生ヒトプロテインCのアミノ酸残基33～39(上記の番号に従う)をコードしているもう1つのDNAリンカーを付加することにより、該プラスミドを修飾した。次いで、このプラスミド(pCZ451と命名)をBamHIで切断した後、アミノ酸残基39～445をコードしている、プラスミドpHC7の～1.2kb BamHIフラグメントを挿入し、プラスミドpCZ445を得た。さらに、初期の組立て段階で偶然付加された余分なNdeIリンカーを除去することによつてプラスミドpCZ455を修飾し、プラスミドpCZ459を得た。

プラスミドpCZ459は、メチオニル残基と新生プロテインCのアミノ酸残基33～445を発現させる様に位置しているlppプロモーターを含んでいる。コピー数コントロールが失われる温度(>25℃)の下で、プラスミドpCZ459は大腸菌内で、メチオニル残基、新生ヒト

プロテインCのアミノ酸残基33～445、および最初に大腸菌1pp遺伝子から単離されたプラスミドDNAによってコードされていた約36のアミノ酸残基、を含む分子量約50キロダルトンの機能的ポリペプチドを発現する。プラスミドpCZ459の制限サイトおよび機能地図を添付の第12図に示す。

プラスミドpCZ459に、ヒトプロテインCのカルボキシ末端であるアミノ酸残基446～461をコードしているDNAを挿入し、プラスミドpCZ460を得た。このプラスミドpCZ460の組立ては、まずカルボキシ末端暗号DNAを含有している、プラスミドpHC7の～0.88 kb Pst I 制限フラグメントをプラスミドpUC19〔ファーマシア(Pharmacia) Inc.、800 センテナル・ドライブ、ピスカタウェイ(Centennial Dr. Piscataway) NJ 08854 から入手可能〕に挿入し、プラスミドpUC19HCを得ることにより、行われた。プラスミドpUC19HCは、プロテインC構造遺

OR等のプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。さらに、trpプロモーターとlacプロモーターの如く、1またはそれ以上のプロモーターを直列に配したり、lacプロモーターの如く、ハイブリッドプロモーターを用いて、プロテインC構造遺伝子の発現を行わせることもできる。上記のプロモーターは、いずれも、既に特性化されており、当業者が熟知しているものであつて、合成的に、あるいは既知のプラスミドから組立てることができるものである。

プラスミドpCZ460の複製は、ショーナークら〔Schoner et. al. (1984) プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスUSA、81 5403～5407〕の開示した熱誘導性(サーモインジューサブル)ランナウエイレプリコンにより、きめることができる。30℃、特に25℃以下の温度では、このレプリコンは約10～15コピー/細胞という、比較的低いコピー数を保持している。温度が37℃にまで上ると、コピー数コントロー

伝子のカルボキシ末端暗号DNAを単離することができ～80 bp BamHI 制限フラグメントを含有している。プラスミドpUC19HCをBamHIで開裂して～80 bp BamHIフラグメントを単離し、これをプラスミドpCZ459に挿入することにより、プラスミドpCZ460を得た。プラスミドpCZ460は新生ヒトプロテインCのアミノ酸残基2～32が存在しないことを除き、これと同じポリペプチドをコードしており、これを発現させる。プラスミドpUC19HCとプラスミドpCZ460の詳しい組立て方法を実施例11に示す。

特殊なプロモーターの選択は、本発明の実施可能性(オペラビリティ)にとつて臨界的な事ではないので、ヒトプロテインC活性の大腸菌内での発現は、決して、特定のプロモーターの使用に限定されない。既に例示したりボタンパク質プロモーターに代り得るプロモーターには、大腸菌ラクトース(lac)、大腸菌trp、バクテリオファージ $\lambda$  P<sub>L</sub>O<sub>L</sub>、およびバクテリオファージ $\lambda$  P<sub>R</sub>

ルが失なわれ、このレプリコンを含有しているプラスミドは、1000～2000コピー/細胞にまで増幅される。当業者ならば理解するであろうが、本発明は、決して、特定のランナウエイレプリコン、または特定のコピー数の突然変異体しか使用してはならないというものではない。その他の誘導可能なランナウエイレプリコンまたは高コピー数のレプリコンを、適切な選択により、あるいは組立てることにより、得ることができる。その様なレプリコンも、本発明の範囲内に含まれる発現ベクターの組立てに用いることができる。

本発明に係るヒトプロテインC誘導体遺伝子の如き外来性遺伝子をランナウエイレプリコンを含有しているベクターにクローニングすると、誘導に際してコントロールが外される結果、タンパク質の合成速度が著しく大きくなると共に、細胞質内にタンパク性顆粒が形成される。この顆粒のタンパク組成の均質性は高く、この顆粒の少なくとも50%、多くは80%(いずれも乾重量%)以上が所望のタンパク質生産物からなる。この顆粒



は、容易に細胞リゼイト（溶解液）から単離され、また、低濃度の尿素、あるいは洗浄剤溶液で洗浄しても安定である。洗浄することにより、顆粒に対して非特異的に結合しているタンパク質が除かれる。

しかしながら、本発明は、大腸菌内でプロテインC活性を発現させる場合にランナウエイレプリコンを使用しなければならないというものではない。プラスミド pBR322、pBR328、pACYC184等のプラスミドに由来する多くのレプリコンが当業者に知られており、それらは、本発明のプロテインC-暗号DNAを発現させるために設計された、組換えDNAクロニング、および発現ベクターの組立てに適している。本発明はまた、本明細書中に例示したプラスミドに含まれている実際の選択マーカーの使用に限定されるものでもない。本発明のDNA化合物（または配列）を含んでいる組換えDNAクロニングベクター、または発現ベクターに用いるのに適当な、真核性並びに原核性宿主細胞用の、広範囲に及ぶ

るものではない。

本発明の原核性発現ベクターおよび本発明方法は、広範囲の宿主生物、とりわけ、大腸菌、大腸菌 K12、大腸菌 K12 RSV308、大腸菌 K12 HB101、大腸菌 K12 C600、大腸菌 K12 RR1、大腸菌 K12 RR1ΔM15、大腸菌 K12 MM294等のグラム陰性菌に適用し得る。本発明のすべての態様が有用であるが、いくつかのベクターおよび形質転換体が好ましい。好ましい形質転換体は、大腸菌 K12 RV308/pCZ460である。

当業者には理解されるであろうが、本発明の発現ベクターは真核性または原核性いずれの宿主細胞にも用いることができ、その様にして、ヒトプロテインC活性を有するポリペプチドを宿主に発現させることができる。宿主細胞内で機能し、新生ヒトプロテインC構造遺伝子の転写を駆動する様なプロモーターを含有しているベクターで該宿主細胞を形質転換すると共に、該宿主細胞がシグナルペプチドのプロセッシングを行うための細胞機

種々の選択マーカーが存在している。

本発明の例示DNA配列およびプラスミドには多くの修飾や変更が可能である。例えば、遺伝暗号の同義性により、本明細書中に例示した翻訳終止（停止）シグナルTAGをTAAまたはTGA

```

      | | |   | | |   | | |
      A C T   A T T   A C T

```

で置き換えることのみならず、ポリペプチドの暗号領域全体を通して、スクレオチドの置換を行うことができる。その様な配列は、ヒトプロテインCについて現在知られているアミノ酸配列またはDNA配列から推定することができ、下記の従来からの合成法により、組立てることができる。その様な合成法は、実質上、イタクラらの方法 [Itakura et. al., 1977 サイエンス (Science) 198: 1056] 並びにクレアらの方法 [Crea et. al., 1978、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス USA 75: 5765] に従って行うことができる。従って、本発明は特に例示したDNA配列およびプラスミドに限定され

構を有しているならば、培地から、プロテインC活性を単離することができる。他の発現状況下、例えば、プラスミド pCZ460が大腸菌 RV308中に含まれている場合には、プロテインC活性を宿主細胞から単離しなければならない。

前記の如く、組換え法によつて生産されたプロテインCは血栓性の疾患の治療に優れた効果を現わすことであろう。ホモ接合体性またはヘテロ接合体性のプロテインCを欠損している人々は重篤な血栓症に苦しんでおり、今日では、凝固因子である第IX因子濃縮物（これはプロテインCを含んでいる）によつて治療されている。これらの内、ホモ接合体性プロテインC欠損症の人々の治療には、血漿が～3000 mlであると仮定し、血管外空隙への幾分かの拡散を見積ると、酵素を酵素原の形で投与するとすると、組換え法で生産されたプロテインCを、用量域5mg～100mg/投与を1日2回与えるといふ。また、ヘテロ接合体性のプロテインC欠損症の場合に必要なプロテインCの用量はホモ接合体性の場合よりも低く、酵素原

の形として、用量域は2.5 ㍉～50 ㍉/投与となる。

組換えにより生産されたプロテインCは、深部静脈血栓症、肺動脈塞栓症、末梢動脈血栓症、心臓または末梢動脈で生じた塞栓、急性心筋梗塞症、血栓性発作および伝染性血管内凝血等を含む、血管内凝固に関連する広範な種々の後天性の疾患状態を予防、並びに治療するのにも有用であろう。実験データ並びに臨床データによると、従来からの抗凝血剤、特にワルファリン(warfarin)は、侵入性のがんの治療に有用であり、その様な悪性腫瘍が転移し離れた病巣を生じることが阻止または減少させる様、作用することが分っている。組換えにより生産されたプロテインCは、以下に詳しく述べる理由に基づき、これらの臨床状況において従来用いられていた抗凝固剤の代替品として重要なものである。

深部静脈血栓症や肺動脈塞栓症は従来からの抗凝血剤で治療できるが、例えば、手術を受けている患者、慢性的な就床患者、およびうつ血性心不

一生産プロテインCの用量は1～10 ㍉/日の範囲であり、プロテインCの投与は、手前前6時間から開始し、患者が動ける様になるまで続ける必要がある。確定的で客観的に証明された深部静脈血栓症および/または肺動脈塞栓症の場合の活性なプロテインCの投与量は、負荷用量として1～10 ㍉、以後、3～30 ㍉/日の範囲の量の継続注入、とする。末梢動脈の塞栓の場合にも同様な投与計画をたてることができる。活性プロテインCの注入により、出血性の合併症が減少されることが思われることから、急性の動脈閉鎖を併発し、その場合に、四肢の切断を避け、四肢を守ることがしばしば要求される血栓切除術または塞栓切除術と関連した外科的処置において、ヘパリンの代りに活性プロテインCを用いることができる。

心臓に発生する動脈塞栓は、人工心臓弁を有する患者における心臓弁と関連した疾患、急性心筋梗塞、およびある種のタイプの不整脈等の心疾患に併発していることが多い。この様な問題に対する従来からの経口抗凝固剤による治療は必ずしも

全症患者等、血栓塞栓症を併発する危険率が高いとされている患者に対して、血栓塞栓症の発現を防止することは、臨床的により有意義なことである。手術を受けた年齢が50歳の患者の50%以上が、また全体としては、手術を受けた患者の約20%以上が術後の深部静脈血栓症に苦しんでおり、また、深部静脈血栓症の術後には、全症例中約20%が1またはそれ以上の肺動脈塞栓を併発している。今日、深部静脈血栓症の防止のために、術前および術後に低用量のヘパリン(例えば8時間毎に5,000単位)を投与している。低用量のヘパリン投与は時々、手術中または手術後に重篤な出血を引き起こす。活性化されたプロテインCはヘパリンよりも選択性が高く、トロンビンが生成し、線維素トロンビンが形成された時、およびその位置でしか活性を示さない。それ故、プロテインCは、深部静脈血栓症を防止するために予防的に用いたとき、ヘパリンよりも有効であり、しかも、出血性合併症を引き起こし難いと思われる。深部静脈血栓症の予防を目的とする場合の組換え

完全に有効であるといえず、しかも、経口抗凝固剤の使用には、常に、出血が併発する危険性が本質的に存在している。確立された深部静脈トロンビン-肺動脈塞栓の治療に匹敵し得る用量の活性プロテインCを携帯用のポンプで連続注入する方法は、心臓性の塞栓の予防に、実質上有効である。

同様に、末梢動脈(特に、頸動脈)中の血栓が発生源となつている塞栓は、血小板機能の抑制作用を有する薬物、経口抗凝固剤、またはそれらの複合剤を含む現在用いられている治療方法によっては十分に治療または予防することができない。心臓性の塞栓の場合の如く、この心臓性塞栓に関して示したと同様のやり方で活性プロテインCを長期間投与する方法は、頸動脈血栓に由来する塞栓を防ぎ、塞栓症性の発作に至ることを防止するのに大いに有効である。

組換えプロテインCはまた、血栓性発作の治療にも有用である。今日、発作は、常に従来からの抗凝固剤で治療し得るわけではない。ヘパリンまたは経口抗凝固剤による発作の治療も時には有効

であるが、梗塞を起こしている脳領域での出血の危険性を高め、そのことにより、発作に伴う神経学的な損傷を悪化させる。プロテインCは出血性の合併症を引き起こす可能性が低いので、これを発作を起こした患者に投与することで閉鎖性の動脈血栓の局所的な拡大を防止でき、その結果、発作に起因する神経学的損傷を軽減することができる。活性プロテインCの投与量は発作の性質および重篤度に応じて、各患者毎に異なる。

組換え法で生産された活性プロテインCは、インビボでの線維素(フィブリン)溶解の促進能力を有しているため、急性心筋梗塞の治療に有効である。活性プロテインCを、組織プラスミノゲン賦活剤と一緒に、心筋梗塞の急性期に投与するとよい。閉塞性の冠血栓が溶解した後、冠性の再閉塞を防止するために、活性プロテインCをさらに数日ないし数週間投与する。急性の心筋梗塞の場合には、組織プラスミノゲン活性化剤による治療の開始時に、プロテインCを負荷用量として1~10mg与え、以後、3~30mg/日の用量域

ンCは高い選択性を有するので、ヘパリンや経口抗凝固剤の如き、播種性血管内凝固に関連した出血性障害を悪化させることがないばかりか、さらに微小血管性のフィブリン析出物が形成されることを遅延させ、あるいは阻止する。播種性血管内凝固のための製剤としては、活性化されたセリンプロテアーゼよりもプロテインC酵素原を選択するのがよい。そうすれば、これらの患者の微小循環内に実質的な量存在するトロンボモジュリン-トロンビンにより、該酵素原の活性なセリンプロテアーゼへの完全な活性化が確保されることになる。必要とされる用量は、治療開始時において循環液中に存在するプロテインCの量に応じて異なるが、ホモ接合体性、またはヘテロ接合体性のプロテインC欠損症の場合の用量に匹敵する量である。

従来からの抗凝固剤、特にワルファリンは侵入性の悪性腫瘍を治療するのに有用であることを示す証拠が提示されている。多くの腫瘍細胞は、局所的なフィブリンの析出を招く様な、凝固系の活

で、プロテインCを連続注入する。

プロテインC酵素原または活性型のプロテインCは播種性血管内凝固の治療に有用である。前記の如く、おそらく、トロンボモジュリン(血栓調節因子)-トロンビンによるタンパク質の広範囲に及ぶ活性化と、それに続くその活性化された酵素の異化または不活化を含む機構により、播種性血管内凝固においてはプロテインCのレベルが著しく減少する。広範な臨床試験において、播種性血管内凝固症患者に対するヘパリンおよび経口抗凝固剤の投与が行われたが、それらの試験の結果は期待外れであつた。播種性血管内凝固症患者は、特徴的に、微小循環をも含め、広い範囲に及ぶ血栓を有し、広域性微小循環内のフィブリントロンビンの形成の間に、まず活性化され、次いで不活化されることによる必須凝固因子(essential clotting factors)の「消費」に起因する重篤な出血性の障害を伴うことが多い。播種性血管内凝固においては、プロテインCは従来の抗凝固剤とは明らかに異なる利点を有する。プロテ

性を引き起こす物質を産生する。これらのフィブリン析出物は、がん細胞が分割して転移病巣を作る際の「巣」の役割を果たす。1つの臨床研究によると、肺に小さい細胞性のがんを有する患者において、がんの化学療法に加えてワルファリンを投与されていた患者は、この化学療法のみを受けた患者よりも長く存命し、転移病巣の広がりも少ないということが示された。しかしながら、この研究で採用されたがんの化学療法は、今日、臨床腫瘍学において適切と考えられている治療法程強力ではなかった。より強力ながんの化学療法においては、殆んど常に、血小板の大幅な減少をもたらし、そして、血小板減少症とワルファリン治療との組み合わせによつて、患者は重篤な出血性合併症の容認し難い程高い危険性にさらされることになる。活性プロテインCは従来の抗凝固剤よりも高い選択性を有し、ヘパリンまたは経口抗凝固剤のいずれよりも、はるかに高い治療指数を有するので、血小板減少症患者に投与しても比較的安全であり、従つて、活性プロテインCと併用する

ことにより、侵入性がんの患者を、有効な強度の化学療法で治療することができるのである。活性プロテインCによる侵入性がんの治療は、深部静脈血栓症-肺動脈塞栓の場合に用いられる投与計画に準じて行う。

本発明化合物は薬学的に有用な組成物を調製するための既知の方法に従って製剤化されることができる。即ち、本発明のヒトプロテインC産物と薬学的に許容し得る担体賦形剤とを混合することにより、組成物を調製する。適当な担体賦形剤、および例えばヒトアルブミンの如き他のヒトタンパク質をも含むそれらの製剤化は、当業者周知である。その様な組成物中には、宿主(患者)に対して有効な投与を行うのに適当な薬学的に許容し得る組成物を調製する上で適量の担体賦形剤と一緒に、有効量のプロテインCが含有されている。このプロテインC組成物は非経口的に投与することができるが、該物質が確実に有効な形で血流中に運ばれる様な他の方法によっても投与され得る。以下の実施例により、本発明をさらに詳しく説

明する。本発明の組立てに用いた方法、及びその方法の説明を適宜記載した。

**実施例 1** 大腸菌 (*E. coli*) K12 RR1 / pHC7 の培養およびプラスミド pHC7 の単離  
A. 大腸菌 K12 RR1 / pHC7 の培養

テトラサイクリン  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  を含有している LB ブロス (10 g ペプトン、10 g NaCl、および 5 g 酵母エキス) 1 l に大腸菌 K12 RR1 / pHC7 (NRRL B-15926) を接種し、エア-シェーカー (空気振盪機) 内で  $37^\circ\text{C}$  において、 $590 \text{ nm}$  における光学的密度 (O.D.) が  $\sim 1$  吸収単位になるまでインキュベートし、この時点でクロラムフェニコール  $150 \mu\text{g}$  を加えた。約 16 時間インキュベーションを続けた；このクロラムフェニコールの添加によつてタンパク質合成が阻止され、その結果、以後の細胞分割は阻害されたが、プラスミドの複製は継続された。

B. プラスミド pHC7 の単離

実施例 1 A で調製した培養物を、ソルボール (Sorvall) GSA ローター (ジューボン (DuPont))

co.、インスツルメント・プロダクツ (Instruments Product)、バイオメジカル・ディビジョン (Biomedical Division)、ニュータウン (Newtown)、CN 06470 <sup>中、</sup>  $4^\circ\text{C}$  において  $6000 \text{ rpm}$  で 5 分間遠心した。得られた上清を捨て、細胞ペレットを TES バッファ (10 mM トリス-HCl、pH 7.5；10 mM NaCl；および 1 mM EDTA)  $40 \text{ ml}$  中で洗浄し、次いで再ペレット化した。再度、上清を捨てた後、細胞ペレットをドライアイス-エタノール浴中で凍結させ、次いで解凍した。解凍した細胞ペレットを 25% スクロース / 50 mM EDTA 溶液  $10 \text{ ml}$  に再懸濁した。5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  リゾチーム溶液  $1 \text{ ml}$ ；0.25 M EDTA  $3 \text{ ml}$ 、pH 8.0；および 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の RNAse A  $100 \text{ ml}$  を加えて混合した後、得られた溶液を氷上で 15 分間インキュベートした。溶解液 [3  $\text{ml}$  の 10% トリトン (Triton) - X 100、75  $\text{ml}$  の 0.25 M EDTA、pH 8.0；15  $\text{ml}$  の 1 M トリス-HCl、pH 8.0；および水 7  $\text{ml}$  を混合して調製] 3  $\text{ml}$  をこのリゾチ

ーム処理細胞に加え、混合し、得られた溶液を氷上でさらに 15 分間インキュベートした。溶解した細胞をドライアイス-エタノール浴中で凍結した後、解凍した。

SW 27 ローター〔ベックマン(Beckman) 7360 N. リンカーン・アベニュー、リンカーンウッド、IL 60646〕中、25,000 rpm で40分間遠心することにより、溶液中の細胞破片を除いた。CsCl 3.044 g と5 ml エチジウムブロマイド溶液を1 ml を加え、溶液の容量を40 ml に調整した後、Vti 50 超遠心管(ベックマン)中にデカントして入れた。チューブをシールした後、溶液をVti 50 ローター中で42,000 rpm において16時間遠心した。紫外光で観察し、得られたプラスミドのバンドを単離した後、ti 75 チューブに入れてローター(ベックマン)内に置き、55,000 rpm で16時間遠心した。必要な用量調節は、いずれも0.761 g / ml のCsCl を含むTES を用いて行つた。再度、プラスミドバンドを単離し、塩飽和イソプロパノールでエチジウムブロマイドを抽出し、TES バッファーで1:3に希釈した。次いで、2容量のエタノールを溶液に加えた後、-20℃で一夜インキュベートした。この溶液をSS34 ロータ

：1、アクリルアミド：ビス-アクリルアミド) 電気泳動にかけ、~1.25 kb BanI 制限フラグメントが他の制限産物から分離されるまで泳動させた。ゲルをまずエチジウムブロマイドの希薄溶液で染色し、次いで、このゲルを紫外線下で観察することにより、DNA バンドを調べた。

~1.25 kb BanI 制限フラグメントを含む領域をゲルから切り取り、試験管内に入れて小片にくずした。この小片の入った試験管内に抽出バッファー(500 mM NH<sub>4</sub>OAc、10 mM MgOAc、1 mM EDTA、1% SDS および10 mg/ml tRNA) 1 ml を加え、37℃で一晩置いた。遠心して残渣をペレット化し、上清を新しいチューブに移した。得られた残渣を抽出バッファー200 µl で1回洗浄し、洗浄上澄み液を、一夜抽出によって得た最初の上清と合わせた。上清をガラスワール製プラグ(plug)に通した後、2容量のエタノールを加えて混合した。得られた溶液をドライアイス-エタノール浴中に~10分間置き、次いで、遠心してDNA をペレット化した。

ー(ソルボール)中、10,000 rpm で15分間遠心することにより、プラスミドDNA をペレット化した。

この方法によつて得たプラスミドpHC7 DNA ~1 kb をTE バッファー(10 mM トリス-HCl, pH 8.0 および1 mM EDTA)中に懸濁し、-20℃で保存した。プラスミドpHC 7の制限サイトおよび機能地図を添付の第1図に示す。

**実施例2** プラスミドpSV2-HPC8の組立て

A. プラスミドpHC7の~1.25 kb BanI 制限フラグメントの組立て

実施例1で調製したプラスミドpHC7 DNA 50 µl を、制限酵素BanI 5 µl (~50単位)、10×BanI 制限バッファー(1.5 M NaCl; 60 mM トリス-HCl, pH 7.9; 60 mM MgCl<sub>2</sub>; および1 mg/ml BSA) 10 µl、および水35 µl と混合し、消化が完了するまでインキュベートした。次に、このBanI消化プラスミドDNA を3.5%ポリアクリルアミドゲル(29

この方法で~1.25 kb BanI 制限フラグメント約8 µg を得た。この精製(純化)フラグメントをTE バッファー10 µl に懸濁し、-20℃で保存した。

B. Hind III-Bcl I-BanI リンカーの組立て

このリンカーの組立てに用いたDNA フラグメントは、システック(System)1450A DNA シンセサイザー(Synthesizer)(システック・インコーポレイテッド3816 チャンドラー・ドライブ、ミネアポリス、MN)またはABS 380A DNA シンセサイザー〔アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)、インコーポレイテッド、850 リンカーン・センター・ドライブ、フォスターシティ、CA 94404〕のいずれかを用いて合成した。当業者は多くのDNA 合成装置を知っており、それらをフラグメントの製造に用いることができる。加えて、これらのフラグメントは、実質上、イタクラらの方法[Itakura et al., 1977 サイエンス(Science), 198:1056]およびクレアらの方法[Crea

et. al., 1978、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス、USA、75:5765]に従って常法通り調製することもできる。

これらの一本鎖リンカー500ピコモルづつを、T4ポリヌクレオチド・キナーゼ15単位(〜0.5  $\mu$ l)、10×リガーゼバッファ(300 mM トリス-HCl、pH=7.8; 10.0 mM  $MgCl_2$ ; 10.0 mM ジチオトレイトール; および1  $\mu$ g/ml BSA) 2  $\mu$ l、500  $\mu$ M ATP 10  $\mu$ l、および水7.5  $\mu$ lを含む制限バッファ20  $\mu$ l中でキナーゼ処理した。37℃で30分間、キナーゼ反応混合物をインキュベートし、次いで、100℃で10分間インキュベートして反応を止めた。キナーゼ処理を確実にするために、反応物を氷上で冷やし、0.2 M ジチオトレイトール2  $\mu$ l、5 mM ATP 2.5  $\mu$ l、およびT4ポリヌクレオチドキナーゼ15単位を加えて混合し、この反応混合物を37℃でさらに30分間インキュベートした。100℃で10分間、インキュベートして反

カー〜50  $\mu$ l (〜500ピコモル)、T4 DNAリガーゼ1  $\mu$ l (〜10単位)、10×リガーゼバッファ10  $\mu$ l、10 mM ATP 10  $\mu$ l および水19  $\mu$ lに加えて混合し、得られたライゲーション反応混合物を4℃で一晩インキュベートした。

65℃で10分間インキュベーションすることにより、ライゲーション反応を止めた。終濃度が0.3 Mになる量のNaOAcと2容量のエタノールを加え、ドライアイス-エタノール浴中で冷却した後、得られた溶液を遠心することにより、DNAをペレット化した。

このDNAペレットを10×Apa I 反応バッファ(60 mM NaCl; 60 mM トリス-HCl、pH=7.4; 60 mM  $MgCl_2$ ; および60 mM 2-メルカプトエタノール) 10  $\mu$ l、制限酵素Apa I 5  $\mu$ l (〜50単位)、および水85  $\mu$ l中に溶かし、この反応混合物を37℃に2時間置いた。次いで、上記の如くにして反応を止め、DNAをペレット化した。このDNAペレットを

応を止め、氷上で冷却した。

キナーゼ処理は別々に行なうが、各キナーゼ反応の後、2本の一本鎖DNAリンカーを混合した。鎖をアニリングするために、〜150 mlの水の入った水浴中で100℃において10分間、キナーゼ反応の反応混合物をインキュベートした。このインキュベーションの後、水浴を閉じ、室温まで放冷した(この工程は、約3時間を要した)。次いで、キナーゼ処理したDNAを含むチューブが入ったままの水浴を、4箇の冷蔵庫内に1夜置いた。この方法により、一本鎖をアニ<sup>リング</sup>した。組立てられたリンカーは式:



で示される構造を有していた。このリンカーを、使用に供するまで-20℃で保存した。

C. 〜1.23 kb Hind III-Apa I 制限フラグメントの組立て

実施例2Aで単離した〜1.25 kb Ban I フラグメント〜8  $\mu$ gを実施例2Bで組立てたリン

10×Hind III 反応バッファ(500 mM NaCl; 500 mM トリス-HCl、pH=8.0; および100 mM  $MgCl_2$ ) 10  $\mu$ l、制限酵素Hind III 5  $\mu$ l (〜50単位) および水85  $\mu$ l中に溶かし、この反応混合物を37℃に2時間置いた。

Hind III 消化の後、反応混合物を3.5%ポリアクリルアミドゲル上に適用し、実質上、実施例2Aの方法に従って所望の〜1.23 kb Hind III-Apa I 制限フラグメントを単離した。所望のフラグメント約5  $\mu$ gを得、TEバッファ10  $\mu$ lに懸濁し、-20℃で保存した。

D. プラスミドpHC7の〜0.88 kb Pst I 制限フラグメントの単離

実施例1で調製したプラスミドpHC7 DNA 50  $\mu$ lを制限酵素Pst I 5  $\mu$ l (50単位)、10×Pst I 反応バッファ(1.0 M NaCl; 100 mM トリス-HCl、pH=7.5; 100 mM  $MgCl_2$ ; および1  $\mu$ g/ml BSA) 10  $\mu$ l、および水35  $\mu$ lと混合し、37℃で2時間イン

キュベートした。次いで *Pst* I-消化プラスミド pHC7 DNA を3.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、実質上、実施例2Aの方法に従って所望の0.88 kb フラグメントを精製した。所望のフラグメント約5 µg を得、これをTEバッファ-10 µl に懸濁し、-20℃に保存した。E. *Pst* I - *Bcl* I - *Bgl* II リンカーの組立て

実質上、実施例2Bの方法に従って、式：



で示されるリンカーをライゲーションに用いるために組立て、調製した。

F. ~0.19 kb *Apa* I - *Bgl* II 制限フラグメントの組立て

実施例2Dで単離した~0.88 kb *Pst* I フラグメント~5 µg を実施例2Eで組立てたリンカー~50 µl (~500ピコモル)、T4 DNA リガーゼ1 µl (~10単位)、10×リガーゼバッファ-10 µl、10 mM ATP 10 µl お

*Bgl* II 制限フラグメントを単離した。所望のフラグメント約1 µg を得、TEバッファ-10 µl に懸濁し、-20℃で保存した。

G. *Hind* III - *Bgl* II-消化プラスミド pSV2-gpt の単離

プラスミド pSV2-gpt DNA (ATCC 37145) 約10 µg を10×*Hind* III 反応バッファ-10 µl、制限酵素 *Hind* III 5 µl (~50単位)、および水85 µl に溶かし、反応混合物を37℃で2時間保った。次いで、この反応混合物をNaOAc 0.25 Mとした後、2容量のエタノールを加え、ドライアイス-エタノール浴中で冷却し、遠心してDNAをベレット化した。

このDNAベレットを10×*Bgl* II バッファ-10 µl、制限酵素 *Bgl* II 5 µl (~50単位)、および水85 µl に溶かし、反応混合物を37℃で2時間保った。*Bgl* II 消化の後、反応混合物を1%アガロースゲル電気泳動にかけ、フラグメントを分離した。エチジウムブロミドと紫外光を用いて観察し、所望の~5.1 kb *Hind* III-*Bgl*

および水19 µl に加えて混合し、得られたライゲーション反応混合物を4℃で一晩インキュベートした。

65℃で10分間インキュベーションすることにより、ライゲーション反応を止めた。ライゲートしたDNAを沈殿させた後、このDNAベレットを10×*Apa* I 反応バッファ-10 µl、制限酵素 *Apa* I 5 µl (~50単位)、および水85 µl 中に溶かし、この反応混合物を37℃に2時間置いた。次いで、反応を止め、再度、DNAをベレット化した。このDNAベレットを10×*Bgl* II 反応バッファ-(1 M NaCl; 100 mM トリス-HCl, pH=7.4; 100 mM MgCl<sub>2</sub> および100 mM 2-メルカプトエタノール) 10 µl、制限酵素 *Bgl* II 5 µl (~50単位) および水85 µl 中に溶かし、この反応混合物を37℃に2時間置いた。

*Bgl* II 消化の後、反応混合物を3.5%ポリアクリルアミドゲル上に適用し、実質上、実施例2Aの方法に従って所望の~0.19 kb *Apa* I -

II フラグメントを含有しているバンドをゲルから切り取って透析チューブ内に入れ、アガロースからDNAが放出されるまで電気泳動を続けた。フェノールとCHCl<sub>3</sub> を用いて透析チューブから、DNAを含有しているバッファ-を抽出した後、このDNAを沈殿させた。このベレットをTEバッファ-10 µl に再懸濁した。このものは、プラスミド pSV2-gpt の所望の~5.1 kb *Hind* III - *Bgl* II フラグメントで構成されていた。

H. プラスミド pSV2-HPC8 の組立てのためのフラグメントのライゲーション

実施例2Cで調製した~1.23 kb *Hind* III - *Apa* I 制限フラグメント2 µl、実施例2Fで調製した~0.19 kb *Apa* I - *Bgl* II フラグメント3 µl、および実施例2Gで調製した~5.1 kb *Hind* III - *Bgl* II フラグメント2 µl を混合し、次いで、10×リガーゼバッファ-10 µl、10 mM ATP 10 µl、T4 DNA リガーゼ1 µl (~10単位) および水72 µl と一緒に16℃で一晩インキュベートした。ライゲートされた

DNAは所望のプラスミドpSV2-HPC8を構成していた。このプラスミドの制限サイトおよび機能地図を添付の第2図に示す。

I. 大腸菌K12 RR1/pSV2-HPC8の組立て  
大腸菌K12 RR1(NRRL B-15210)のL-ブロス中培養物50 mlを590 nmにおけるO.D.が0.2になるまで増殖させた。この培養物を氷上で10分間冷却した後、遠心して細胞を集めた。得られた細胞ペレットを冷100 mM CaCl<sub>2</sub> 25 ml中に再懸濁し、氷上で25分間インキュベートした。遠心して細胞を再度ペレット化し、得られたペレットを冷100 mM CaCl<sub>2</sub> 25 mlに再懸濁して一夜、氷上でインキュベートした。

この細胞懸濁液200 μlを実施例2Hで調製した、ライゲートしたDNAと混合し、氷上で20分間インキュベートした。次いでこの混合物を42℃において2分間、さらに室温で10分間インキュベートした。この細胞混合物にL-ブロス3 mlを加えた後、空気振盪機(エアシェーカー)中、37℃で2時間インキュベートした。

HCl, pH=7.9; 60 mM MgCl<sub>2</sub>; 60 mM 2-メルカプトエタノール; および1 mg/ml BSA) 10 μl、制限酵素Sal I 5 μl(〜50単位)、および水8.5 μlに溶かした。得られたSal I反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。

このHind III-Sal I-消化プラスミドpSV2-HPC8を3.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、所望の〜0.29 kb Hind III-Sal I制限フラグメントが他の反応生成物から明確に分かれるまで、泳動させた。実質上、実施例2Aの方法に従い、所望のフラグメントを精製した。得られたフラグメント〜2 μgをTEバッファ-10 μlに懸濁し、-20℃で保存した。

B. プラスミドpSV2-HPC8の〜1.5 kb Sal I-Bgl II制限フラグメントの単離

プラスミドpSV2-HPC8 50 μgを10×Bgl II反応バッファ-10 μl、制限酵素Bgl II 5 μl(〜50単離)、および水8.5 μlに溶かし、この反応混合物を37℃で2時間インキュ

ベートした。この細胞混合物の一部をアンピシリン100

μg/mlを含んだL-寒天平板(L-ブロス中に寒天15 g/lを含む)に適用し、この平板を37℃でインキュベートした。大腸菌K12 RR1/pSV2-HPC8形質転換体を、そのプラスミドDNAの制限酵素分析により、証明した。選択のための抗生物質としてテトラサイクリンではなく、アンピシリンを用いる外は、実質上、実施例1の方法に従って大腸菌K12 RR1/pSV2-HPC8からプラスミドDNAを得た。

実施例3 プラスミドpL133の組立て

A. プラスミドpSV2-HPC8の〜0.29 kb Hind III-Sal I制限フラグメントの単離

プラスミドpSV2-HPC8 50 μgを10×Hind III反応バッファ-10 μl、制限酵素Hind III 5 μl(〜50単位)、および水8.5 μlに溶かし、この反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。Hind III消化の後、DNAを沈殿させ、得られたDNAペレットを10×Sal I反応バッファ-(1.5 M NaCl; 60 mM トリス-

ベートした。Bgl II消化の後、DNAを沈殿させ、得られたDNAペレットを10×Sal I反応バッファ-10 μl、制限酵素Sal I 5 μl、および水8.5 μlに溶かした。得られたSal I反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。

このSal I-Bgl II-消化プラスミドpSV2-HPC8を3.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、所望の〜1.15 kb Sal I-Bgl II制限フラグメントが他の反応生成物から明確に分かれるまで、泳動させた。実質上、実施例2Aの方法に従い、所望のフラグメントを精製した。得られたフラグメント〜8 μgをTEバッファ-10 μlに懸濁し、-20℃で保存した。

C. プラスミドpSV2-β-グロブリンの〜4.2 kb Bgl II-Hind III制限フラグメントの単離

プラスミドpSV2-β-グロブリン(NRRL B-15928)の所望の〜4.2 kb Bgl II-Hind III制限フラグメントの単離は、プラスミドpSV2-gptの代わりにプラスミドpSV2-β-グロブリン



ンを用いる外は実質上、実施例2 Gの方法に従って行われた。得られたDNA ~ 5  $\mu$ g をTEバッファ-10  $\mu$ l に懸濁し、-20℃で保存した。

D. プラスミドpL133の組立てのための、フラグメントのライゲーション

実施例3 Aで得たフラグメント2  $\mu$ l、実施例3 Bで得たフラグメント2  $\mu$ l、および実施例3 Cで得たフラグメント2  $\mu$ l を一緒に混合し、実質上、実施例2 Hの方法に従ってライゲートさせた。ライゲートしたDNAは所望のプラスミドpL133を構成していた。このプラスミドの制限サイトおよび機能地図を添付の第3図に示す。

E. 大腸菌K12 RR1/pL133の組立て

形質転換のためのDNAとしてプラスミドpSV2-HPC8ではなくプラスミドpL133を用いる外は実質上、実施例2 Iの方法に従い、所望の大腸菌K12 RR1/pL133形質転換体を組立てた。

細胞の培養に用いた抗生物質がテトラサイクリンではなくアンピシリンであることを除き、実質上、

プラスミドpSV2-HPC8の~1.15 kb Sal I -Bgl II制限フラグメント2  $\mu$ l を一緒に混合し、実質上、実施例2 Hの方法に従ってライゲートさせた。ライゲートしたDNAは所望のプラスミドpL132を構成していた。このプラスミドの制限サイトおよび機能地図を添付の第4図に示す。

C. 大腸菌K12 RR1/pL132の組立て

形質転換のためのDNAとしてプラスミドpSV2-HPC8ではなくプラスミドpL132を用いる外は実質上、実施例2 Iの方法に従い、所望の大腸菌K12 RR1/pL132形質転換体を組立てた。

細胞の培養に用いた抗生物質がテトラサイクリンではなくアンピシリンであることを除き、実質上、実施例1の方法に従って大腸菌K12 RR1/pL132形質転換体からプラスミドDNAを得た。

実施例5 プラスミドpL141の組立て

A. プラスミドpSV2-dhfr-Xを得るための、プラスミドpSV2-dhfrにおけるXba I認識配

上、実施例1の方法に従って大腸菌K12 RR1/pL133形質転換体からプラスミドDNAを得た。

実施例4 プラスミドpL132の組立て

A. プラスミドpSV2-neoの~5.7 kb Hind III -Bgl II制限フラグメントの単離

プラスミドpSV2-neo(ATCC 37149)の~5.7 kb Hind III -Bgl IIフラグメントの単離は、プラスミドpSV2-gptの代りにプラスミドpSV2-neoを用いる外は、実質上、実施例2 Gの方法に従って行われた。得られたDNA ~ 5  $\mu$ g をTEバッファ-10  $\mu$ l に懸濁し、-20℃で保存した。

B. プラスミドpL132の組立てのための、フラグメントのライゲーション

プラスミドpSV2-neoの~5.7 kb Hind III -Bgl II制限フラグメント(実施例4 Aで調製)2  $\mu$ l、実施例3 Aで調製したプラスミドpSV2-HPC8の~0.29 kb Hind III-Sal I制限フラグメント2  $\mu$ l、および実施例3 Bで調製した

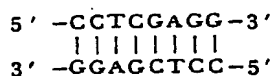
列の組立て

プラスミドpSV2-dhfr(大腸菌K12 HB 101/pSV2-dhfr、ATCC37146から単離)10  $\mu$ gと10 $\times$ BamHI塩類10  $\mu$ l制限酵素BamHI 2  $\mu$ l(~20単位)、および水88  $\mu$ lとを混合し、得られた反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。フェノールおよびクロロホルムで抽出して反応を止めた後、BamHI消化プラスミドpSV2-dhfr DNAを沈殿させ、遠心して集めた。

このDNAペレットを、50 mM DTT 1  $\mu$ l、各dNTPの100 mM溶液4  $\mu$ l、DNAポリメラーゼIのクレノー(klenow)フラグメント1  $\mu$ l[~5単位、ニュー・イングランド・バイオラボス(New England Biolabs)]、水34  $\mu$ l、およびクレア・バッファ- (400 mM KPO<sub>4</sub>、pH=7.5; 66 mM MgCl<sub>2</sub>; および10 mM 2-メルカプトエタノール)5  $\mu$ lに再懸濁し、14℃で1時間インキュベートした。0.25 M EDTA 4  $\mu$ lを加え、次いでフェノール抽出を行うこ

とにより、反応を止めた。反応混合物からDNAを沈殿させ、遠心してベレット化した。DNA 10  $\mu$ gを得、これをTEバッファ-20  $\mu$ lに溶かした。

式：



で示されるXhoIリンカー(類)(ニューイングランドバイオラボ、32トザ-ロード、ベバ-リイ、MA 09195)を下記の方法でキナーゼ処理し、ライゲーションのために調製した。リンカー4  $\mu$ l(〜2  $\mu$ g)を水20.15  $\mu$ lと10×キナーゼバッファ(500 mM トリス-HCl、pH=7.6 および100 mM MgCl<sub>2</sub>)5  $\mu$ lに溶かし、90℃で2分間インキュベートした後、室温まで冷却した。この混合物に $\gamma$ -32p-ATP 5  $\mu$ l(〜20  $\mu$ ci)、1M DTT 2.5  $\mu$ l、およびポリスクレオチドキナーゼ5  $\mu$ l(〜10単位)を加えた後、37℃で30分間インキュベートした。次いで、0.01 mM ATP 3.35  $\mu$ lと、

2  $\mu$ lをTEバッファ-10  $\mu$ lに懸濁した。

次いで、XhoIリンカーを付加したBamHI消化プラスミドpSV2-dhfrをライゲートし、形質転換に係るDNAがプラスミドpSV2-dhfr-Xである外は実質上、実施例2Hおよび2Iの方法に従って大腸菌K12 RR1を形質転換した。

得られた大腸菌K12 RR1/pSV2-dhfr-X形質転換体を、そのアンピシリン耐性表現型、並びにそのプラスミドDNAの制限酵素分析により、同定した。細胞の培養期間中に用いる抗生物質がアンピシリンであることを除き、実質上、実施例1の方法に従い、この形質転換体からプラスミドpSV2-dhfr-Xを単離した。

B. プラスミドpSV2-dhfr-Xの〜4.2 kb EcoRI-XhoI制限フラグメントの単離

プラスミドpSV2-dhfr-X 5  $\mu$ gを10×XhoI反応バッファ-10  $\mu$ l、制限酵素XhoI 5  $\mu$ l(〜50単位)、および水85  $\mu$ lと混合し、得られた反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。反応の後、XhoI消化プラス

さらに5  $\mu$ lのキナーゼを加え、なお30分間、37℃において反応を続けた。次いで、得られた反応混合物を-20℃で保存した。

BamHI-消化、クレノー処理を行なったプラスミドpSV2-dhfr 6.8  $\mu$ l(〜3.4  $\mu$ g)と、キナーゼ処理したXhoIリンカーとを混合し、水11.3  $\mu$ l、10×リガーゼバッファ-3.5  $\mu$ l、10 mM ATP 1.4  $\mu$ l、およびT4 DNAリガーゼ2  $\mu$ l(〜10単位)と一緒に16℃で一晩インキュベートした。65℃で10分間インキュベートすることにより、反応を止めた。

10×XhoI反応バッファ(1.5 M NaCl; 60 mM トリス-HCl、pH=7.9; 60 mM MgCl<sub>2</sub>; 60 mMメルカプトエタノール; および1 mg/ml BSA) 10  $\mu$ l、制限酵素XhoI 5  $\mu$ l(〜100単位)、および水50  $\mu$ lを上記の反応混合物に加え、37℃で4時間インキュベートした。反応混合物を1%アガロースゲル上に適用し、実質上、実施例2Gの方法に従って所望のフラグメントを単離した。得られたフラグメント〜

ミドpSV2-dhfr-X DNAを沈殿させ、遠心して集めた。このDNAベレットを10×EcoRI反応バッファ-10  $\mu$ l、制限酵素EcoRI 5  $\mu$ l(〜50単位)、および水85  $\mu$ lに再懸濁し、得られた反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。EcoRI反応の後、得られたXhoI-EcoRI-消化プラスミドpSV2-dhfr-X DNAを1%アガロースゲルに適用し、実質上、実施例2Gの方法に従い、所望の〜4.2 kb EcoRI-XhoI制限フラグメントを精製した。得られたフラグメント〜10  $\mu$ gをTEバッファ-20  $\mu$ lに懸濁し、20℃で保存した。

C. プラスミドpL133の〜0.64 kb PvuII-BstEII制限フラグメントからのXhoI-BstEII制限フラグメントの組立て

プラスミドpL133 50  $\mu$ gを10×PvuII反応バッファ(600 mM NaCl; 60 mM トリス-HCl、pH=7.5; 60 mM MgCl<sub>2</sub>; 60 mMメルカプトエタノール; および1 mg/ml BSA) 10  $\mu$ l、制限酵素PvuII 5  $\mu$ l(〜50単位)、および水

85  $\mu$ l と混合し、得られた反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。反応の後、Pvu II-消化プラスミドpL133 DNAを沈殿させ、遠心して集めた。

実施例5Aで用いたXho I リンカーと同じリンカー約5  $\mu$ g を実質上、実施例5Aの方法に従ってキナーゼ処理し、Pvu II-消化プラスミドpL133 DNAにライゲートした。ライゲーション反応の後、DNAを沈殿させ、遠心して集めた。

このDNAペレットを10×Xho I反応バッファ-20  $\mu$ l、制限酵素Xho I 10  $\mu$ l (〜100単位)、および水165  $\mu$ l に再懸濁し、37℃で4時間インキュベートした。次いで、この反応混合物に制限酵素Bst E II 5  $\mu$ l (〜50単位)を加えた後、鉱油の下、60℃で4時間インキュベートした。得られたXho I-Bst E II-消化DNAを3.5%ポリアクリルアミドゲルに適用し、実質上、実施例2Aの方法に従い、所望の〜0.64 kb Xho I-Bst E II制限フラグメントを精製した。得られたフラグメント約3  $\mu$ g をTEバッファ

ー6  $\mu$ l に再懸濁し、-20℃で保存した。

D. プラスミドpL133の〜2.7 kb EcoRI-Bst E II 制限フラグメントの単離

プラスミドpL133 50  $\mu$ g を10×Bst E II 反応バッファ-10  $\mu$ l、制限酵素Bst E II 5  $\mu$ l (〜50単位、および水85  $\mu$ l を混合し、得られた反応混合物を鉱油の下、60℃で2時間インキュベートした。反応の後、Bst E II-消化プラスミドpL133 DNAを沈殿させ、遠心して集めた。このDNAペレットを10×EcoRI 反応バッファ-10  $\mu$ l、制限酵素EcoRI 5  $\mu$ l (〜50単位)、および水85  $\mu$ l に再懸濁し、得られた反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。EcoRI 反応の後、得られたBst E II-EcoRI-消化プラスミドpL133 DNAを1%アガロースゲルに適用し、実質上、実施例2Gの方法に従い、所望の〜2.7 kb EcoRI-Bst E II 制限フラグメントを精製した。得られたフラグメント〜10  $\mu$ g をTEバッファ-20  $\mu$ l に懸濁し、20℃で保存した。

E. プラスミドpL141の組立てのためのフラグメントのライゲーション、および大腸菌K12 RR1の形質転換

実施例5Bで調製したプラスミドpSV2-dhfr-Xの〜4.2 kb EcoRI-Xho I 制限フラグメント2  $\mu$ l、実施例5CにおいてプラスミドpL133から組立てた〜0.64 kb Xho I-Bst E II 制限フラグメント2  $\mu$ l、および実施例5Dで調製したプラスミドpL133の〜2.7 kb EcoRI-Bst E II 制限フラグメントを一緒に混合し、実質上、実施例2Hおよび2Iの方法に従ってライゲートし、得られたプラスミドpL141 DNAを用いて大腸菌K12 RR1を形質転換した。所望の大腸菌K12 RR1/pL141 形質転換体をそのアンピシリン耐性表現型とそのプラスミドDNAの制限酵素分析により、同定した。細胞の培養期間中に用いる抗生物質がアンピシリンである外は実質上、実施例1の方法に従い、形質転換体からプラスミドpL141を単離した。プラスミドpL141の制限サイトおよび機能地図を添付の第5

図に示す。

実施例6 プラスミドpL142の組立て

A. プラスミドpRSVcatの〜0.76 kb Nde I-Hind III 制限フラグメントの単離

プラスミドpRSVcat (ATCCに、寄託番号ATCC 37152の下で寄託されている宿主大腸菌HB101から入手可能) 50  $\mu$ g を10×Hind III 反応バッファ-10  $\mu$ l、制限酵素(〜50単位)、および水85  $\mu$ l Hind III 5  $\mu$ l に溶かし、この反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。Hind III 消化の後、DNAを沈殿させ、遠心して集めた。得られたDNAペレットを10×Nde I反応バッファ-(1.5 M NaCl; 100 mM トリス-HCl、pH=7.8; 70 mM MgCl<sub>2</sub>; および60 mM 2-メルカプトエタノール) 10  $\mu$ l、制限酵素Nde I 10  $\mu$ l (〜30単位)、および水85  $\mu$ l に溶かした。得られた反応混合物を37℃で消化が完了するまでインキュベートした。

このHind III-Nde I-消化プラスミドpRSVcat DNAを3.5%ポリアクリルアミドゲル電気

泳動にかけ、 $\sim 0.76$  kb Nde I-Hind III 制限フラグメントを実質上、実施例 2 A の方法に従い、単離、精製した。得られたフラグメント $\sim 5 \mu\text{g}$ をTEバッファ $10 \mu\text{l}$ に懸濁し、 $-20^\circ\text{C}$ で保存した。このフラグメントはラウス肉腫ウイルス由来の長い末端重複のプロモーター活性を含有しており、多くの真核性細胞内でDNA転写におけるプロモーターとして機能する。

#### B. プラスミド pL133 の $\sim 5.1$ kb Nde I-Hind III 制限フラグメントの単離

この単離は、プラスミド pRSVcat の代りにプラスミド pL133 を消化する外は実質上、実施例 6 A の方法に従って行われた。さらに、3.5 % ポリアクリルアミドゲルの代りに1 % アガロースゲルを用い、実質上、実施例 2 G の方法に従ってフラグメントを単離した。得られた約 $5 \mu\text{g}$ の所望のフラグメントをTEバッファ $10 \mu\text{l}$ に懸濁し、 $-20^\circ\text{C}$ で保存した。

#### C. プラスミド pL142 の組立てのためのライゲーション、および大腸菌 K12 RR1 の形質転換

Bgl II  $2 \mu\text{l}$  ( $\sim 20$  単位)、および水 $88 \mu\text{l}$ に溶かし、得られた反応混合物を $37^\circ\text{C}$ で2時間インキュベートした。Bgl II -消化プラスミド pMSVi DNA をフェノールおよびクロロホルムの両者で抽出した後、DNAを水 $10 \mu\text{l}$ に再懸濁した。

Bgl II -消化プラスミド pMSVi DNA  $2 \mu\text{l}$  を下記の実施例 8 C で調製したプラスミド pSV2-HPC8 の $\sim 1.425$  kb Bcl I 制限フラグメント $2 \mu\text{l}$ と混合し実質上、実施例 2 H および 2 I の方法に従い、2つのフラグメントをライゲートし、これを用いて大腸菌 K12 RR1 を形質転換した。

所望の pMSV-HPC 形質転換体をそのプラスミド DNA の制限酵素分析と、そのアンピシリン耐性およびテトラサイクリン耐性表現型により同定した。プラスミド pMSV-HPC の制限サイトおよび機能地図を添付の第 7 図に示す。プラスミド pMSV-HPC 上にはネズミ肉腫ウイルス配列が存在しているので、このプラスミドを包膜し(カプ

実施例 6 A で単離したプラスミド pRSVcat の $\sim 0.76$  kb Nde I-Hind III 制限フラグメント $2 \mu\text{l}$ を実施例 6 B で単離したプラスミド pL133 の $\sim 5.1$  kb Nde I-Hind III 制限フラグメント $1 \mu\text{l}$ にライゲートした。ライゲーションは実質上、実施例 2 H の方法に従って行われた。ライゲートされた DNA は所望のプラスミド pL142 を構成しており、これを用いて実質上、実施例 2 I の方法に従って大腸菌 K12 RR1 を形質転換した。大腸菌 K12 RR1/pL142 形質転換体を、そのアンピシリン耐性表現型とそのプラスミド DNA の制限酵素分析により、同定した。プラスミド pL142 の制限サイトおよび機能地図を添付の第 6 図に示す。形質転換体からのプラスミド pL142 の単離は、細胞の培養に際して用いる抗生物質がアンピシリンであることを除き、実質上、実施例 1 の方法に従って行つた。

#### 実施例 7 プラスミド pMSV-HPC の組立て

プラスミド pMSVi (NRRL B-15929)  $10 \mu\text{g}$ を $10\times$ Bgl II バッファ $10 \mu\text{l}$ 、制限酵素

シドで包み)、広い宿主域を有するヘルパーウイルス[例、アンフトロピック (amphotropic)、ネズミ白血病ウイルス]またはその様なヘルパー機能を担っているセルラインによつて供給される転移-活性機能を有する透過性のベクターにすることができる。この方法により、ベクターの形質転換能を大いに高め、ベクターが発現し得る宿主細胞の範囲を広げることができる。

#### 実施例 8 プラスミド pMMTΔBPV-HPC の組立て

##### A. 中間体プラスミド pMMTΔBPV の組立て

プラスミド pdBPV-MMTneo (ATCC37224) 約 $1 \mu\text{g}$ を、 $10\times$ BamHI 反応バッファ $10 \mu\text{l}$ 、制限酵素 BamHI  $5 \mu\text{l}$  ( $\sim 50$  単位)、および水 $85 \mu\text{l}$ と混合し、得られた反応混合物を $37^\circ\text{C}$ で2時間インキュベートした。

$65^\circ\text{C}$ で5分間インキュベートした後、BamHI 消化プラスミド pdBPV-MMTneo DNA をリガーゼバッファで濃度約 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に希釈し、T4 DNA リガーゼでライゲートした後、得られ

たプラスミド pMMT△BPV DNA を用い、実質上、実施例 2 H および 2 I の方法に従って大腸菌 K12 RR1 を形質転換した。大腸菌 K12 RR1 /pMMT△BPV 形質転換体を、そのアンピシリン耐性表現型とそのプラスミド DNA の制限酵素分析により同定した。細胞培養に際して用いる抗生物質がアンピシリンである外は実質上、実施例 1 の方法に従って形質転換体からプラスミド pMMT△BPV DNA を単離した。

#### B. Bgl II - 消化プラスミド pMMT△BPV の調製

プラスミド pMMT△BPV DNA 10 μg を 10 × Bgl II バッファー 10 μl、制限酵素 Bgl II 5 μl (〜50 単位)、および水 85 μl に溶かし、得られた反応混合物を 37℃ で 2 時間インキュベートした。次いで、この反応混合物をフェノールで 1 回、さらにクロロホルムで 1 回抽出し、DNA を沈殿させ、遠心して集めた。この様にして得た Bgl II - 消化プラスミド pMMT△BPV ~10 μg を TE バッファー 20 μl に懸濁し、20

KCl: 60 mM トリス-HCl、pH = 7.4 : 100 mM MgCl<sub>2</sub>: 10 mM ジチオトレイトール; および 1 mg/ml BSA) 10 μl、制限酵素 Bcl I 5 μl (〜50 単位) および水 85 μl に溶かし、得られた反応混合物を 50℃ で 2 時間インキュベートした。この Bcl I - 消化プラスミド pSV2-HPC8 DNA を 1% アガロースゲルに適用して所望の ~1.425 kb Bcl I 制限フラグメントを単離し、実質上、実施例 2 G の方法に従って精製した。得られたフラグメント ~5 μg を TE バッファー 10 μl に溶かし、-20℃ に保存した。

#### D. プラスミド pMMT△BPV-HPC の組立てのためのライゲーションおよび大腸菌 K12 RR1 の形質転換

実施例 8 B で調製した Bgl II - 消化プラスミド pMMT△BPV DNA 2 μl と、実施例 8 C で単離した、プラスミド pSV2-HPC8 の ~1.425 kb Bcl I 制限フラグメント 2 μl とを混合し、実質上、実施例 2 H および 2 I の方法に従ってライゲートし、得られたプラスミド pMMT△BPV-

で保存した。

#### C. プラスミド pSV2-HPC8 の ~1.425 kb Bcl I 制限フラグメントの単離

制限酵素 Bcl I によって DNA を完全に消化するためには、認識配列中のデオキシアデニル残基がメチル化されてはならない。Bcl I 消化に供されるプラスミド DNA を大腸菌内で生産する場合には、大腸菌 K12 GM48 (NRRL B-15725) の如く、アデニンメチラーゼ欠損株を用いる必要がある。

形質転換のために大腸菌 K12 GM48 を用意し、これを、実質上、実施例 2 I の方法に従い、プラスミド pSV2-HPC8 で形質転換した。細胞培養中に用いる抗生物質がアンピシリンである外は、実質上、実施例 1 の方法に従って大腸菌 K12 GM48/pSV2-HPC8 形質転換体からプラスミド pSV2-HPC8 DNA を単離した。

大腸菌 K12 GM48/pSV2-HPC8 形質転換体から単離したプラスミド pSV2-HPC8 DNA 50 μg を 10 × Bcl I 反応バッファー (750 mM

HPC DNA を用いて大腸菌 K12 RR1 を形質転換した。所望の大腸菌 K12 RR1 /pMMT△BPV-HPC 形質転換体を、そのアンピシリン耐性表現型とそのプラスミドの制限酵素分析により、同定した。細胞培養中に用いる抗生物質がアンピシリンである外は実質上、実施例 1 の方法に従って形質転換体からプラスミド pMMT△BPV-HPC を単離した。プラスミド pMMT△BPV-HPC の制限サイトおよび機能地図を添<sup>付</sup>の第 8 図に示す。

#### 実施例 9 プラスミド pL151 の組立て

A. プラスミド pL142 から導かれる ~1.06 kb Bst E II - Xho I 制限フラグメントの組立て

プラスミド pL142 DNA 50 μg を 10 × Nde I 反応バッファー 10 μl、制限酵素 Nde I 5 μl (〜50 単位)、および水 85 μl に溶かし、得られた反応混合物を 37℃ に 2 時間置いた。反応後、DNA を沈殿させ、遠心して集めた。DNA ペレットをクレノーバッファーに再懸濁し、実質上、

実施例5Aの方法に従ってNde I-消化 DNA をクレノー酵素で処理した。クレノー反応の後、DNAを再度沈殿させ、遠心して集めた。

実質上、実施例5Aの方法に従ってXho リンカー(5'-CCTCGAGG-3')をキナーゼ処理し、ライゲーションのために調製してNde I-消化、クレノー処理プラスミドpL142 DNA にライゲートした。このライゲーション反応物を熱で不活性化した後、DNAを沈殿させ、遠心して集めた。

このDNAペレットを10×Xho I 反応バッファ-20 μl、制限酵素Xho I 10 μl (~100 単位)および水170 μl に溶かし、得られた反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。次いで、この反応混合物に制限酵素Bst E II 5 μl (~50 単位)を加え、鉱油下60℃で4時間インキュベートした。フェノール沈殿の後、消化DNAをアクリルアミドゲルに適用し、実質上、実施例2Aの方法に従って~1.06 kb Bst E II-Xho I 制限フラグメントを単離し、精製し

選択し、そのプラスミドDNAの制限酵素分析により、同定した。このプラスミドpL151の制限サイトおよび機能地図を添付の第9図に示す。

#### 実施例10 プラスミドpCZ11の組立て

##### A. 中間体プラスミドpCZ118の組立て

プラスミドpCZ101 10 μg を10×Nde I 反応バッファ-10 μl、制限酵素Nde I 10 μl (~20 単位)、および水80 μl に溶かし、得られた反応混合物を37℃において、消化が完了するまでインキュベートした。このNde I-消化プラスミドpCZ101 DNAを沈殿させ、遠心して集めた。このDNAペレットを10×EcoRI 反応バッファ-10 μl、制限酵素EcoRI 2 μl (~20 単位)、および水88 μl に溶かし、得られた反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。

再度DNAを沈殿させ、遠心して集めた後、実質上実施例5Aの方法に従い、Nde I-EcoRI 消化プラスミドpCZ101 DNA を、クレノー酵素で処理した。このクレノー処理DNAをリガー

た。所望のフラグメント約5 μg を得、これをT E バッファ-10 μl に懸濁し、-20℃で保存した。

B. ライゲーション、並びにプラスミドpL151 および大腸菌K12 RR1/pL151の最終的な組立て

実施例9Aで調製した、プラスミドpL142 から導かれた~1.06 kb Bst E II-Xho I 制限フラグメント2 μl を実施例5Bで調製したプラスミドpSV2-dhfr-Xの~4.2 kb EcoRI-Xho I 制限フラグメント2 μl、および実施例5Dで調製したプラスミドpL133の~2.74 kb Bst E II-EcoRI 制限フラグメント2 μl にライゲートした。ライゲーション反応は、実質上、実施例2Hの方法に従って行われた。

ライゲートされたDNAは所望のプラスミドpL151を構成しており、これを用いて、実質上、実施例2Iの方法に従い、大腸菌K12 RR1 を形質転換した。所望の大腸菌K12 RR1/pL151 形質転換体をアンピシリン含有培地上で

ゼババッファ-中で濃度約0.1 μg/μl に希釈し、次いで、実質上実施例2Hの方法に従って自己ライゲートさせた。DNA配列決定の結果、クレノー酵素にスクレアーゼが混ざっていることが判明し、いくらか分解されていたが、ℓppプロモーターには著しい影響がなかった。コンピテント大腸菌K12 RV308 細胞を用意し、形質転換用DNAを加えた後25℃以上の温度で細胞をインキュベートしない、ということの外は、実質上、実施例2Iの方法に従い、プラスミドpCZ118 DNAで形質転換した。すなわち、形質転換するDNAを細胞と混合し、氷上で30分ないし1時間インキュベートした後、細胞を遠心して集めた。得られた細胞ペレットをL-ブロス-1 mlに再懸濁し、この懸濁液を25℃において1時間インキュベートした後、選択用平板上にプレートした。大腸菌K12 RV308/pCZ118 形質転換体をそのカナマイシン耐性表現型とそのプラスミドDNAの制限酵素分析により同定した。この形質転換体を、カナマイシンと一緒にTYブロス中、

低温(−25℃)で、600nmにおけるO.D.が0.5〜1.0に達するまで培養し、次いで、それらを37℃で4時間またはそれ以上インキュベートすることにより、該形質転換体からプラスミドpCZ118DNAを単離した。次に細胞を集め、実質上、実施例1Bの方法に従いプラスミドpCZ118DNAを単離した。

#### B. 中間体プラスミドpCZ141の組立て

プラスミドpCZ118DNA 10μgを10×BamHIバッファ−10μl、制限酵素BamHI 2μl(〜20単位)、および水88μlに溶かし、得られた反応混合物を37℃で2時間置いた。このBamHI-消化プラスミドpCZ118DNAを沈殿させ、遠心して集めた。このDNAペレットをクレノーバッファ−に再懸濁し、実質上、実施例5Bの方法に従ってクレノー酵素で処理した。次に、得られたBamHI-消化、クレノー処理プラスミドpCZ118DNAを65℃において5分間インキュベートした。

NdeI リンカー(5'-CCATATGG-3'

のカナマイシン耐性表現型とそのプラスミドDNAの制限酵素分析により、同定した。実質上、実施例10Aの方法に従い、形質転換体からプラスミドpCZ141DNAを単離した。

プラスミドpCZ141のDNA配列決定により、クレノー酵素による処理の際、予測された様に、BamHI オーバーラップ(重複)の\*充填(filled in)\*がなされていないことが分った。その代り、BamHI オーバーラップと隣接する配列は、NdeIリンカーの付加に先立ち、プラスミドpCZ118DNAから除かれてしまっていた。この混合スクレアーゼ活性は、実質的に、以後のプラスミドpCZ459の組立てには影響を及ぼさなかった。

#### C. 中間体プラスミドpCZ10の組立て

プラスミドpCZ141 10μgを10×XbaI反応バッファ−(500mM NaCl; 60mM トリス-HCl, pH=7.9; 60mM MgCl<sub>2</sub>; および1mg/ml BSA) 10μl、制限酵素XbaI 5μl(〜50単位)、および水85μlに溶かし、得ら

ニューイングランドバイオラボ供給)をキナーゼ処理し、ライゲーションのために調製して、実質上、実施例5Aの方法に従い、BamHI-消化、クレノー処理プラスミドpCZ118DNAにライゲートした。リンカーがライゲートされた後、酢酸ナトリウム(NaOAc)を、制限酵素NdeI 10μl(〜30単位)と一緒に、終濃度が150mMになる様に加え、得られた反応混合物を37℃において、NdeIによる消化の完了が認められるまで、インキュベートした。次いで、このNdeI消化DNAを1%アガロースゲルに適用し、実質上、実施例2Gの方法に従い、〜9.2kb NdeI制限フラグメントを単離し、精製した。〜5μgのフラグメントを得、これをTEバッファ−10μlに懸濁した。

上記の如くにして調製したDNA 4μlを自己ライゲートし、得られたプラスミドpCZ141DNAを用い、実質上、実施例12Aの方法に従って大腸菌K12 RV308を形質転換した。大腸菌K12 RV308/pCZ141形質転換体をそ

れた反応混合物を37℃で2時間インキュベートした。このXbaI-消化プラスミドpCZ141DNAを沈殿させ、遠心して集めた。このDNAペレットを10×NdeI反応バッファ−10μl、制限酵素NdeI 10μl(〜30単位)、および水80μlに再懸濁し、得られた反応混合物を37℃で消化が完了するまでインキュベートした。

このNdeI-XbaI-消化プラスミドpCZ141DNAを1%アガロースゲルに適用し、実質上、実施例2Gの方法に従って〜8.6kb制限フラグメントを単離し、精製した。約5μgのフラグメントを得、これをTEバッファ−10μlに懸濁した。

式:



で示されるDNAリンカーを合成し、キナーゼ処理して実質上、実施例2Bの方法に従い、ライゲーションのために調製した。このリンカーは、両端に位置する一本鎖DNA配列を介して、プラス

ミドpCZ141の～8.6 kb Nde I-Xba I制限フラグメントとライゲーションされる。プラスミドpCZ141のXba I部位はこのプラスミド上に存在している $\ell$ ppプロモーターの直ぐ下流に位置している。上記のリンカーはアデニル並びにチミジル残基に富む配列であり、Nde I<sup>認識</sup>配列に挿入されるあらゆる構造遺伝子のための、強力なリボソーム結合部位をコードしている。

プラスミドpCZ141の～8.6 kb Xba I-Nde I制限フラグメント2  $\mu$ lと上記のXba I-Nde Iリンカー100ピコモルとをライゲートし、得られたプラスミドpCZ10 DNAを、実質上、実施例10Aの方法に従って大腸菌K12 RV308に導入(トランスフォーム)した。大腸菌K12 RV308/pCZ10形質転換体を、そのカナマイシン耐性表現型とそのプラスミドDNAの制限酵素分析によって同定した。実質上、実施例10Aの方法に従い、この形質転換体からプラスミドpCZ10を単離した。プラスミドpCZ10の制限サイトおよび機能地図を添付の第11図に示す。

(～50単位)およびH<sub>2</sub>O 170  $\mu$ lに溶解し、得られた反応液を37℃で2時間インキュベートした。実質上、実施例2Aの方法に従って、このBamHI-HgiAIで消化したプラスミドpCZ101 DNAを3.5%ポリアクリルアミドゲルにかけ、～0.6 kbのBamHI-HgiAI制限フラグメントを単離し、精製した。約5  $\mu$ gのフラグメントが得られ、TE緩衝液10  $\mu$ lに懸濁させ、-20℃で貯蔵した。

以下の配列：

```
5' -CTAGAGCGGTATTAATA ATG TTC CCA TTG GAG
      |||||
3' -TCCCATAAATTAT TAC AAG GGT AAC CTC
```

```
GAT GAT TAA ATG TTC CCA GCC ATG TCC TTG
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
CTA CTA ATT TAC AAG GGT CCG TAC AGG AAC
```

```
TCC GGC CTG TTT GCC AAC GCT GTGCT-3'
||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
AGG CCC GAC AAA CCG TTG GGA C-5'
```

で示されるDNAリンカーを、実質上、実施例2Bの方法に従って、ライゲーション用に構築し、キナーゼ処理し、調製した。上記のDNAリンカーは、Xba I-HgiAI切断DNAに適合する、

#### D. 中間体プラスミドpCZ114の構築

プラスミドpCZ101 DNA 10  $\mu$ gを、10×Xba I反応緩衝液10  $\mu$ l、制限酵素Xba I 2  $\mu$ l(～20単位)およびH<sub>2</sub>O 88  $\mu$ lに溶解し、得られた消化液を37℃で2時間インキュベートした。このXba I消化したプラスミドpCZ101 DNAを遠心によって沈殿させ、集めた。このDNAペレットを、10×BamHI反応緩衝液10  $\mu$ l、制限酵素BamHI 2  $\mu$ l(～20単位)およびH<sub>2</sub>O 88  $\mu$ lに溶解し、得られた反応液を37℃で2時間インキュベートした。実質上、実施例2Gの方法に従って、このXba I-BamHIで消化したプラスミドpCZ101 DNAを1%アガロースゲルにかけ、～10.2 kbのXba I-BamHI制限フラグメントを単離し、精製した。約5  $\mu$ gのフラグメントが得られ、TE緩衝液10  $\mu$ lに懸濁させ、-20℃で貯蔵した。

プラスミドpCZ101 DNA 50  $\mu$ gを、10×BamHI反応緩衝液20  $\mu$ l、制限酵素BamHI 5  $\mu$ l(～50単位)、制限酵素HgiAI 5  $\mu$ l

単鎖DNA延長部を有している。

実質上、実施例10Aでの教示に従ってプラスミドpCZ101の～10.2 kb Xba I-BamHI制限フラグメント2  $\mu$ l、プラスミドpCZ101の～0.6 kb BamHI-HgiAI制限フラグメント2  $\mu$ l、および上記リンカー100ピコモルをライゲーションし、得られたプラスミドpCZ114 DNAで、E. coli K12 RV308を形質転換した。このE. coli K12 RV308/pCZ114形質転換体は、そのカナマイシン耐性の表現型によって、およびそのプラスミドDNAの制限酵素分析によって同定した。プラスミドpCZ114は、実質上、実施例10Aの方法に従って形質転換体から単離した。プラスミドpCZ114は本質的にプラスミドpCZ101と同様の制限部位および機能地図を有している。

#### E. プラスミドpCZ114由来の～0.9 kb Nde I-Kpn I制限フラグメントの構築

プラスミドpCZ114 DNA 50  $\mu$ gを、10  $\mu$ lの10×Sma I反応緩衝液[1.5 MのNaCl、



60 mM のトリス-HCl (pH = 7.4)、60 mM の  $MgCl_2$ 、100 mM の 2-メルカプトエタノール、および 1 mg/ml の BSA ]、5  $\mu$ l (～50 単位) の制限酵素 Sma I および 85  $\mu$ l の  $H_2O$  に溶解し、得られた反応液を 37℃ で 2 時間 インキュベートした。反応を、フェノールおよび  $CHCl_3$  抽出によつて終結させ、次いで Sma I 消化したプラスミド pCZ114 DNA を遠心して集めた。

Nde I リンカー [5'-CCATATGG-3'; ニューイングランド・バイオラプス (New England Biolabs)] を、実質上、実施例 10 B の方法に従つて、キナーゼ処理し、そして Sma I 消化したプラスミド pCZ114 DNA にライゲーションした。ライゲーションをフェノールおよび  $CHCl_3$  抽出で終結させた後、DNA を沈殿させ、集めた。この DNA ペレットを 10  $\mu$ l の 10×Kpn I 反応緩衝液 [60 mM の NaCl、60 mM のトリス-HCl (pH = 7.5)、60 mM の  $MgCl_2$ 、60 mM の 2-メルカプトエタノール、および 1 mg/ml の BSA ]、5  $\mu$ l (～50 単位) の制限酵素

させた。次いで、10×Nde I 反応緩衝液 20  $\mu$ l、制限酵素 Nde I 5  $\mu$ l (～50 単位)、および  $H_2O$  75  $\mu$ l を加えた後、37℃ で 2 時間 インキュベートして、この Kpn I 消化した DNA を Nde I で消化した。

この Kpn I-Nde I 消化したプラスミド pCZ10 DNA を、実質上、実施例 2 G の方法に従つて、1% アガロースゲルにかけ、～7.9 kb Nde I-Kpn I 制限フラグメントを精製した。約 5  $\mu$ g のフラグメントが得られ、TE 緩衝液 10  $\mu$ l に懸濁させた。

プラスミド pCZ10 の～7.9 kb Nde I-Kpn I 制限フラグメント 2  $\mu$ l およびプラスミド pCZ114 の～0.9 kb Nde I-Kpn I 制限フラグメント 2  $\mu$ l を、実質上、実施例 10 A の方法に従つて、ライゲーションし、得られたプラスミド pCZ11 DNA で *E. coli* RV308 を形質転換した。この *E. coli* K12 RV308/pCZ11 形質転換体は、そのカナマイシン耐性の表現型によつて、およびそのプラスミド DNA の制限酵素分析によつて同定

Kpn I、および 85  $\mu$ l の  $H_2O$  に溶解し、得られた反応液を 37℃ で 2 時間 インキュベートした。65℃ で 10 分間加熱することによつて反応を終結させた。室温まで冷却した後、10×Nde I 反応緩衝液 20  $\mu$ l、制限酵素 Nde I 15  $\mu$ l (～45 単位)、および  $H_2O$  65  $\mu$ l を Kpn I 消化した DNA に加え、得られた反応液を 37℃ で数時間 インキュベートした。

この Nde I-Kpn I 消化した DNA を、実質上、実施例 2 A の方法に従つて、3.5% ポリアクリルアミドゲルにかけ、～0.9 kb Nde I-Kpn I 制限フラグメントを単離し、精製した。約 5  $\mu$ g の所望のフラグメントが得られ、10  $\mu$ l に懸濁させ、-20℃ で貯蔵した。

#### F. プラスミド pCZ11 の最終的な構築

プラスミド pCZ10 DNA 10  $\mu$ g を、10×Kpn I 反応緩衝液 10  $\mu$ l、制限酵素 Kpn I 5  $\mu$ l (～50 単位)、および  $H_2O$  85  $\mu$ l に溶解し、得られた反応液を 37℃ で 2 時間 インキュベートした。65℃ で 10 分間 インキュベートして反応を終結

した。実質上、実施例 10 A の方法に従つて、形質転換体からプラスミド pCZ11 を単離した。

プラスミド pCZ10 に存在する 1pp プロモーターおよび合成リボソーム結合部位の「下流」に、BamHI 制限酵素認識部位を配置するように、プラスミド pCZ11 を構築した。この BamHI 部位によつて、プラスミド pCZ11 に、プロテイン C 活性をコードしている DNA 配列を挿入し、該配列を 1pp プロモーターの制御下に置くことができる。この構築を下記の実施例 11 に開示する。

#### 実施例 11

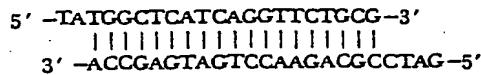
プラスミド pCZ460 の構築および *E. coli* におけるプロテイン C 誘導体の発現

##### A. 中間体プラスミド pCZ451 の構築

プラスミド pCZ11 (10  $\mu$ g) を、10×BamHI 反応緩衝液 10  $\mu$ l、制限酵素 BamHI 5  $\mu$ l (～10 単位)、制限酵素 Nde I 5  $\mu$ l (～10 単位) および  $H_2O$  80  $\mu$ l に溶解し、得られた反応液を 37℃ で 2 時間 インキュベートした。この Nde I-BamHI 消化したプラスミド pCZ11 DNA

を、実質上、実施例2 Gの方法に従って、1%アガロースゲルにかけ、~8.6 kb Nde I-Bam HI 制限フラグメントを単離し、精製した。約5  $\mu$ g のフラグメントが得られ、TE緩衝液10  $\mu$ l に懸濁させた。

以下の配列：



で示されるDNAリンカーを、実質上、実施例2 Bの方法に従って、ライゲーション用に構築し、キナーゼ処理し、調製した。このリンカーは、上記調製のNde I-Bam HI 消化したプラスミド pCZ11 DNAとのライゲーションが可能で、単鎖DNA延長部を有している。メチオニンのコドン、および新生ヒトプロテインCのアミノ酸残基33-39のコドンをコードするように、このリンカーを設計した。アデニルおよびチミジルに富むようにし、それでもなお天然のヒトプロテインCにおけると同様のアミノ酸配列を暗号化するようにリンカーを設計した。既述したように、新生

#### B. 中間体プラスミド pCZ455 の構築

プラスミド pCZ451 を、10×Bam HI 反応緩衝液10  $\mu$ l、制限酵素 Bam HI 2  $\mu$ l (~20 単位) および H<sub>2</sub>O 88  $\mu$ l に溶解し、得られた反応液を37℃で2時間インキュベートした。反応をフェノールおよびCHCl<sub>3</sub>抽出で終結させた後、遠心によってDNAを沈殿させ、集めた。

Bam HI 消化したプラスミド pCZ451 DNA 10  $\mu$ g を TE 緩衝液 20  $\mu$ l に溶解し、-20℃で貯蔵した。

E. coli K12 RV308 には DNA 制限-修飾系が存在するので (E. coli K12 RR1 には存在しない)、実施例1で単離したようなプラスミド pHC7 DNA は、プラスミド DNA を修飾するが制限はしない宿主細胞に導入して形質転換し、この細胞から単離しなければならない。本発明の構築においては、プラスミド pHC7 から単離した Bam HI フラグメントは E. coli K12 RV308 制限系によって制限されないため、このようなサイクリングは必要ない。しかし、一般的にはこのような

ヒトプロテインC構造遺伝子の、推定の信号ペプチドを暗号化している領域は、原核生物宿主細胞用に設計した発現プラスミドには含めなかった。

実質上、実施例10 Aの方法に従って、プラスミド pCZ11 の~8.6 kb Nde I-Bam HI 制限フラグメント2  $\mu$ l と上記リンカー100ピコモルをライゲーションし、得られたプラスミド pCZ451 DNA を使用して E. coli K12 RV308 を形質転換した。E. coli K12 RV308/pCZ451 形質転換体は、そのカナマイシン耐性の表現型によつて、およびそのプラスミド DNA の制限酵素分析によつて同定した。実質上、実施例10 Aの教示に従って、形質転換体からプラスミド pCZ451 DNA を単離した。

プラスミド pCZ451 を部分的に配列決定することにより、このプラスミドは、プラスミド pCZ11 の構築の間に、Nde I リンカーが複数個直列に結合したため、2つの Nde I 部位を有することがわかった。直列に並んだ Nde I 部位は望ましくなく、実施例11 Cに記載のようにして除去した。

サイクリングが必要である。E. coli K12 JA2 21 (NRRL B-15211) はこのようなサイクリングに適する宿主である。

プラスミド pHC7 DNA 50  $\mu$ g を、10×Bam HI 反応緩衝液10  $\mu$ l、制限酵素 Bam HI 5  $\mu$ l (~50 単位) および H<sub>2</sub>O 85  $\mu$ l に溶解し、得られた反応液を37℃で2時間インキュベートした。Bam HI で消化したプラスミド pHC7 DNA を、実質上、実施例2 Gの教示に従って、1%アガロースゲルにかけ、~1.2 kb Bam HI 制限フラグメントを単離し、精製した。約5  $\mu$ g のフラグメントが得られ、TE緩衝液10  $\mu$ l に溶解し、-20℃で貯蔵した。

実質上、実施例10 Aの方法に従って、Bam HI 消化したプラスミド pCZ451 (2  $\mu$ l) およびプラスミド pHC7 の~1.2 kb Bam HI 制限フラグメント2  $\mu$ l をライゲーションし、得られたプラスミド pCZ455 DNA を使用して E. coli K12 RV308 を形質転換した。この E. coli K12 RV308/pCZ455 転換体を、そのカナマイシン

耐性の表現型によつて、およびそのプラスミド DNA の制限酵素分析によつて同定した。実質上、実施例 10A の教示に従つて、形質転換体からプラスミド pCZ455 を単離した。

プラスミド pHC7 の  $\sim 1.2$  kb BamHI 制限フラグメントは、BamHI で消化したプラスミド pCZ451 に、2 配向のどちらでもライゲーションすることができる。これら 2 配向のうちの 1 方だけ (プラスミド pCZ455 と称される) が、プロテイン C を暗号化する DNA を正確に再構築する。プロテイン C のヌクレオチド配列がわかつているので、正しい配向は制限酵素分析によつて容易に同定される。プラスミド pCZ455 においては、 $\sim 1.2$  kb BamHI 制限フラグメント内に位置する Bgl II 制限酵素認識配列が、1pp プロモーターの 3' 末端に位置する Xba I 制限酵素認識配列のできるだけ近くに配置されるように、この  $\sim 1.2$  kb BamHI 制限フラグメントを配向させる。

#### C. 中間体プラスミド pCZ459 の構築

得られ、TE 緩衝液  $10 \mu\ell$  に懸濁させた。

実質上、実施例 10A の方法に従つて、実施例 10F で調製したプラスミド pCZ10 の  $\sim 7.9$  kb Nde I-Kpn I 制限フラグメント  $2 \mu\ell$  とプラスミド pCZ455 の  $\sim 1.9$  kb Nde I-Kpn I 制限フラグメントをライゲーションし、得られたプラスミド pCZ459 DNA で E. coli RV308 を形質転換した。この E. coli K12 RV308/pCZ459 形質転換体を、そのカナマイシン耐性の表現型によつて、およびそのプラスミド DNA の制限酵素分析によつて同定した。実質上、実施例 10A の方法に従つて、形質転換体からプラスミド pCZ459 を単離した。プラスミド pCZ459 の制限部位および機能地図を、添付の第 12 図に示す。

プラスミド pCZ459 は、先に番号を付した新生ヒトプロテイン C のアミノ酸残基 33 $\sim$ 445 のコドンコードしている DNA と、その前のメチオニンコドンコードしている DNA を発現させるために配置された 1pp プロモーターを含有している。従つて、プラスミド pCZ459 は、真

実施例 11A に記載したように、プラスミド pCZ451 および pCZ455 における直列に並んだ複数の Nde I 制限部位の存在は望ましくない。この直列部位は、1pp プロモーターとプロテイン C を暗号化する DNA の開始コドンの間に位置しており、プロテイン C 暗号化配列の mRNA 転写の枠外読み取りを引き起こすことがある。従つて、プラスミド pCZ455 ( $50 \mu\text{g}$ ) を  $10\times$  Kpn I 反応緩衝液  $10 \mu\ell$ 、制限酵素 Kpn I  $5 \mu\ell$  ( $\sim 50$  単位) および  $\text{H}_2\text{O}$   $85 \mu\ell$  に溶解し、得られた消化液を  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間インキュベートした。次いで、この Kpn I 消化したプラスミド pCZ455 DNA を、 $10\times$  Nde I 反応緩衝液  $20 \mu\ell$ 、制限酵素 Nde I  $15 \mu\ell$  ( $\sim 45$  単位) および  $\text{H}_2\text{O}$   $65 \mu\ell$  に添加した後、得られた反応液を  $37^\circ\text{C}$  で Nde I 消化が完結するまでインキュベートして、Nde I 消化を行なつた。

実質上、実施例 2G の方法に従つて、 $\sim 1.9$  kb Nde I-Kpn I 制限フラグメントを反応混合物から単離し、精製した。約  $5 \mu\text{g}$  のフラグメントが

核生物の信号ペプチドのアミノ酸残基 2 $\sim$ 32 およびプロテイン C のカルボキシ末端における最後の 16 アミノ酸残基をコードしている部分のみを欠く、ほとんどすべての新生プロテイン C 構造遺伝子を含有する。プラスミド pCZ459 のプロテイン C を暗号化している部分の 3' 末端に位置する DNA は、E. coli のリボタンパク遺伝子由来であり、プロテイン C を暗号化している DNA と共に転写される。

プラスミド pCZ459 の 1pp プロモーターから転写される mRNA は、ポリペプチド、すなわちそのアミノ末端にメチオニン残基を有し、これに新生ヒトプロテイン C のアミノ酸残基 33 $\sim$ 445 が続き、次いでこれにリボタンパク遺伝子由来の DNA によつて暗号化されている以下のアミノ酸配列 (前記の定義を使用して) :

ARG-LEU-SER-ASN-ASP-VAL-ASN-ALA-MET-ARG-SER-ASP-VAL-GLN-ALA-ALA-LYS-ASP-ASP-ALA-ALA-ARG-ALA-ASN-GLN-ARG-LEU-ASP-ASN-MET-ALA-THR-LYS-TYR-ARG-LYS-COOH  
が続く、ポリペプチドに翻訳される。この融合遺

伝子の産物は、5.5キロダルトン(kd)の計算分子量を有し、E.coli K12 RV308/pCZ459 形質転換体を37℃で培養すれば、該産物を含有する顆粒を産生する。

この顆粒は、約35 kd および22 kd の測定分子量を有する、融合遺伝子産物の2つの異なるサブフラグメントをも含有する。理論的には、これらのサブフラグメントは、ヒトプロテインCの軽鎖および重鎖の間に位置するLYS-ARG配列部分でこの融合遺伝子産物が開裂することにより生成し(新生ヒトプロテインCのアミノ酸残基198および199)、計算分子量31.7 kd および18.8 kd のポリペプチドを生じる。融合遺伝子産物および両サブフラグメントは、天然のヒトプロテインCに対するポリクローナル抗体と反応する。

D.中間体プラスミドpUC19HCの構築およびその~80bp BamHI制限フラグメントの単離

10 μg のプラスミドpUC19 [市販品より入手可能、ファーマシア・P-L・バイオケミカル

した細胞を、50 μg/mlのアンピシリン、1 mM のIPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトシド)、および50 μg/mlのXG (5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド)を含有するL-寒天指示平板上に植えた。プラスミドpUC19で形質転換した細胞は指示平板上で青色を呈し、一方プラスミドpUC19HCで形質転換した細胞は指示平板上で白色であつた。

プラスミドpHC7の~0.88 kb PstI制限フラグメントは2つの方向のどちらでも挿入することができるので、プラスミドDNAの制限酵素分析を使用してE.coli K12 RR1ΔM15/pUC19HC 形質転換体を同定した。プラスミドpUC19HCとは、プラスミドpUC19由来DNAのBamHI制限部位に近接している、~0.88 kb PstI制限フラグメントのPstIオーバーラップ(重複)の1個から~60 kb 離れてBamHI制限部位を配置している配向であるものをいう。選択に使用する抗生物質がテトラサイクリンではなくアンピシリンであること以外は、実

ズ・インコーポレーション(Pharmacia P-L Biochemicals, Inc.)、ニュージャージー08854、ビスカタウェイ、センテナリアル・アベニュー、800番(800 Centennial Ave., Piscataway, N.J. 08854)]を、10×PstI反応緩衝液10 μl、制限酵素PstI 2 μl (~20単位)およびH<sub>2</sub>O 88 μlに溶解し、得られた反応液を37℃で2時間インキュベートした。フェノールおよびCHCl<sub>3</sub>抽出によつて反応を終結させた後、遠心によりDNAを沈殿させ、集めた。このPstI消化したプラスミドpUC19 DNAペレットをTE 20 μlに溶解し、-20℃で貯蔵した。

実質上、実施例2Gおよび2Hの方法に従つて、このPstI消化プラスミドpUC19 DNA 2 μlを、実施例2Dで調製したプラスミドpHC7の~0.88 kb PstI制限フラグメント1 μlにライゲーションし、得られたプラスミドpUC19HC DNAを使用してE.coli K12 RR1ΔM15(NRRL B-15440)を形質転換した。この形質転換

質上、実施例1の方法に従つて、プラスミドpUC19HCを形質転換体から単離した。

プラスミドpUC19HCのDNA 100 μgを、10×BamHI反応緩衝液10 μl、制限酵素BamHI 10 μl (~100単位)およびH<sub>2</sub>O 80 μlに溶解し、得られた反応液を37℃で2時間インキュベートした。実質上、実施例2Aの方法に従つて、BamHIで消化したプラスミドpUC19HCのDNAを、6.5%ポリアクリルアミドゲルにかけ、~80bp BamHI制限フラグメントを精製した。約1 μgのフラグメントが得られ、TE緩衝液5 μlに懸濁させ、-20℃で貯蔵した。

E. BamHI消化プラスミドpCZ459の調製およびプラスミドpCZ460の最終的な構築

プラスミドpCZ459(5 μg)を、10×BamHI反応緩衝液2 μl、制限酵素BamHI 1 μl (~5単位)およびH<sub>2</sub>O 17 μlに溶解し、得られた反応液を37℃で5分間インキュベートした。フェノールおよびCHCl<sub>3</sub>抽出によつて反応を終

結させた。部分的なBamHI消化物を得るため、反応時間を短くした。この、部分的にBamHI消化したプラスミドpCZ459を沈殿させ、集めた後、実質上、実施例2Hの教示に従って、DNAペレットをリガーゼ緩衝液に懸濁させ、プラスミドpUC19HCの～80bp BamHI制限フラグメント2μlにライゲーションした。

所望のプラスミドpCZ460 DNAを構成しているこのライゲーションDNAを使って、実質上、実施例10Aの方法に従い、E.coli K12 RV308を形質転換した。E.coli K12 RV308/pCZ460形質転換体を、そのカナマイシン耐性の表現型によつて、およびそのプラスミドDNAの制限酵素分析によつて同定した。プラスミドpCZ460を実質上、実施例10Aの方法に従って、形質転換体から得た。

～80bpフラグメントは、2つの可能な方向の両方向で、かつ、プラスミドpCZ459の2つのBamHI制限酵素認識部位の両部位に挿入することができた。従つて、様々なプラスミドが上記

のライゲーション中に産生した。プラスミドpCZ460は、適切なBamHI部位に、また同時に、プロテインCを暗号化しているDNA配列の再構築に必要な方向で、～80bp BamHI制限フラグメントを挿入して得られるプラスミドに与えられる名称である。従つて、プラスミドpCZ460においては、新生ヒトプロテインCのアミノ酸残基33～461は、プラスミド上に存在する1ppプロモータと隣接している転写の読み取り相内に位置するDNAセグメント上に、正しくコードされている。プラスミドpCZ460の制限酵素分析により、1以上の～80bp BamHI制限フラグメントが、部分的にBamHI消化したプラスミドpCZ459出発物質にライゲーションしていることがわかつた。正しいプロテインCを暗号化しているDNA配列は適切に再構築されたので、プラスミド上に存在するこの付加的なフラグメントは、プロテインCを暗号化しているDNA配列中に介在していることもなく、また、それを延長するものでもない。

E.coli K12 RV308/pCZ460(NRRL B-15927)形質転換体は、プラスミドpCZ460上に暗号化されたプロテインC誘導体を含む顆粒を産生する。このプロテインC誘導体は約50キロダルトンの測定分子量を有し、DNA配列からの正確な計算値は約48.3kdである。E.coli K12 RV308/pCZ460形質転換体は、抗ヒトプロテインCのポリクローナルまたはモノクローナル抗体と交差反応する、測定分子量50kd、22kd、および34kdの3種類の異なるポリペプチドを産生する。22kdおよび34kdのポリペプチドは、活性なヒトプロテインCの軽鎖と重鎖を分離する、リジンおよびアルギニン残基部分(前記、形成されつつあるヒトプロテインCに付与されるアミノ酸配列の残基198および199に対応する)での50kdのプロテインC誘導体の切断(計算分子量29.5kdおよび18.8kdのポリペプチドを生じるであろう)に起因すると考えられている。

#### 実施例12

#### HepG-2/pL133形質転換体の構築

次に挙げる方法はHepG-2/pL133形質転換体の構築について記載するものであるが、プラスミドpSV2-HPC8、pL132、pL151、pMSV-HPC、pL141、pL142、およびpMMTΔBPV-HPC等、本発明の他のプラスミドすべてのHepG2形質転換体の構築にも同様に適用することができる。さらに、この方法は、好ましいセルラインとして本明細書中第1表に挙げたセルラインにも一般的に適用することができる。真核性宿主細胞のための形質転換法は、当分野で既知である。たとえば、ワイグラー等[Wigler et al., プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス米国(P.N.A.S. USA)、76、1373頁(1979)]およびグラハム等[Graham et al., バイロロジー(Virology)、52、456頁(1973)]。

#### A.細胞の調製

ヒト肝臓芽細胞腫の細胞、HepG-2(ATCC #HB8065)の培養物を、形質転換当日に40～

50%の面生長(融合度)が得られるように、形質転換に先だつて1~2日継代培養した。形質転換の2~3時間前に培地を交換した。それぞれの形質転換には、25 ml フラスコの細胞培養物1つを必要とする。

#### B. DNAの調製

プラスミド pL133 DNA 10~20  $\mu$ g を、2 M の  $\text{CaCl}_2$  62.5  $\mu$ l および  $\text{H}_2\text{O}$  437.5  $\mu$ l に加えた。次いで、この0.5 ml の DNA を、0.5 ml の  $2\times\text{HeBS}$  [10 g/L ベース (pH=7.5)、16 g/L の  $\text{NaCl}$ 、0.74 g/L の  $\text{KCl}$ 、0.25 g/L の  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ 、および2 g/L のデキストロス]に滴下し、乳状の沈殿を生成させた。この混合物を細胞に加える前に、室温で10~20分間放置した。インキュベーションを長くすると、うまく形質転換しない、粗い沈殿を生じることがあるが、時折、沈殿を生じさせるためにより長いインキュベーション時間が必要になることがある。

#### C. 細胞の形質転換

実施例12Bで調製したDNA溶液1 ml を、選

子およびプロテアーゼを含有するため、培地に使用しなかつた。

通常は形質転換の約96時間後に、一時検定のために、5 mM の最終濃度となるように酪酸ナトリウムを加えた。G418 R または dhfr 遺伝子のような選択マーカーを含有するプラスミドを包含する形質転換のために、安定な形質転換体の選択が望ましい時には、酪酸ナトリウムは加えず、選択剤(たとえば400  $\mu$ g/ml G418)を形質転換の約2~4日後に加えた。この時にはウシ胎児血清を含有する完全な培地を加え、選択培地で、2~3週間、5~7日毎に培地を変えながら細胞を増殖させる。次いで個々のクローンを、さらに分析するため単離する。

#### D. プロテインCの検定

HepG-2/pL133 形質転換体および擬形質転換 HepG-2 細胞を、形質転換の96時間後に、プロテインCについて検定した。擬形質転換細胞は、形質転換操作にかけたが、形質転換するDNAには接触させなかつたものである。この検定に

やかに搅拌しながら25 ml フラスコの HepG-2 細胞に加え、37℃で3~4時間インキュベートした。細胞を切り離さないように注意しながら、細胞を、血清を含まない増殖培地(ダルベッコの変性イーグル培地、ギブコ)で2回洗浄した。15%のグリセリンを含むHeBS 1 ml を細胞に加え、次いで37℃で2分間インキュベートした。

この「グリセリン-ショック」インキュベーションは、血清を含まない増殖培地を加え、次いで血清を含まない増殖培地で2回洗浄することによって終結させた。次に、血清代用品[ウシ血清アルブミンまたはウルトロサーG (Ultrosor-G)、リアクティブ・イー・ペー・エフ・フオク・シミ (Reactiff I.B.F. Foc. Chim.) (LKB)、ポアンテ・ギラル (Pointet Girard)、92390 ビルヌベラ・ギヤレンヌ (Villeneuve-la Garenne)、フランスより市販]を含有する完全な、新鮮な増殖培地および12.5  $\mu$ g/ml ビタミン  $\text{K}_1$  を加え、細胞を37℃のインキュベーターに戻した。ウシ胎児血清は、プロテインC検定を妨害するウシ因

は、後述するようにプロテインCに対する抗体を必要とする。プロテインCに対する抗体を調製するための、プロテインC精製のための技術は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体調製のための技術と同様、当分野で知られている。

ヤギ抗-ヒトプロテインCポリクローナル抗体を、96-ウェル(くぼみ)の組織培養皿中で一晚インキュベートし、抗体をプラスチックに結合させた。ウェルを緩衝液で洗浄した後、HepG-2/pL133 形質転換体からの、および擬形質転換した HepG-2 細胞からの培地試料をこのウェルに加えた。この培地試料は形質転換の96時間後に採取した。このウェル中の培地試料を、37℃で2時間インキュベートした後、ウェルを緩衝液ですすぎ、マウス抗-ヒトプロテインCモノクローナルIgG をウェルに加え、4℃で1晩インキュベートした。

未結合のモノクローナル抗体を緩衝液ですすぎ流した後、ペルオキシダーゼでコンジュゲートした、ヒッジ抗-マウスIgG をウェルに加え、37

で2時間インキュベートした。緩衝液ですすいだ後、A B T S (2,2'-アジノ-ジ-3-エチルベンゾチアゾリンスルホン酸塩)の溶液をウェルに加え、室温かつ暗所でのインキュベーションを継続し、試料の光学密度を30分毎に2時間、405nmで測定した。

本質的に、この検定は、皿に付着しているポリクローナル抗体に結合するプロテインCによつて行なわれる。次いでモノクローナル抗体がプロテインCに結合し、ペルオキシダーゼをコンジュゲートした抗マウスIgGがモノクローナル抗体に結合するようになる。ペルオキシダーゼは時間依存性の反応でA B T Sと反応し、405nmに強い吸収がある生成物を与える。簡単に言えば、試料中のプロテインCが多ければ多いほど、405nmでのO.D.測定値は高くなる。

HepG-2/pL133形質転換体は、擬形質転換細胞の10倍までの測定値を与え、HepG-2/pL133形質転換体において、プラスミド制御のプロテインCが発現していることを示した。HepG-

コピーが存在するので、DXB11/pL141形質転換体はより多数のプロテインCを発現する。前記のようにこの増幅は当分野でよく知られており、野生種のdhfr遺伝子を含有するプラスミドで形質転換された宿主細胞を、増加量のメトトレキセイトにさらすことによつて行なう。このメトトレキセイト仲介の増幅は、多種多様の宿主細胞において行なうことができ、dhfr<sup>-</sup>セルラインに限定はされない。LLC-MK<sub>2</sub>/pL132形質転換体で行なつたプロテインC検定は、調整培地1mlあたり約25ngのプロテインCを示した。

### 実施例13

#### 組み換えヒトプロテインC酵素原の活性化

本実施例は、組み換えヒトプロテインCを発現し、分泌する哺乳動物細胞の調整組織培養培地から単離した組み換えヒトプロテインCに適用する。調整組織培養培地に含有されるプロテインCを、予め精製することなく、直接活性化することもできる。

活性化は、ウシトロンビンと複合したワサギト

2細胞は染色体性のプロテインC構造遺伝子を含んでいるので、mRNAを形質転換体から単離し、プラスミドにコードされたプロテインCのメッセージ(情報)が存在するかどうかを測定した。その結果、この形質転換体が、染色体由来のプロテインCのmRNAより<sup>多い</sup>5X<sub>△</sub>プラスミド由来のプロテインCのmRNAを有していることがわかった。測定値は、調整培地1mlあたりプロテインC約100~300ngに対応する。

同様の検定をCHO-K1(dhfr<sup>-</sup>)/pL141形質転換体について行ない、調整培地1mlあたりのプロテインCが約1.8μgであることを測定した。DXB11宿主細胞のようなCHO-K1(dhfr<sup>-</sup>)宿主細胞は、CHO-K1細胞に見い出される野生種のジヒドロ葉酸還元酵素を欠いている。このようなdhfr<sup>-</sup>CHO-K1宿主細胞は、よく知られた方法に従つて得ることができる。組み換えDNAの増幅により、HepG-2/pL133形質転換体よりDXB11/pL141形質転換体の方に、より多くの組み換えプロテインC遺伝子

ロンボモジュリン(thrombomodulin)を利用し、この複合体をアガロースビーズ上に固定する。アガロースビーズは沈殿性であり、従つて容易に活性化混合物から除去される。トロンボモジュリン-トロンピンは、次に示す方法で容易にアガロースビーズに固定化できる。ワサギトロンボモジュリンに対して高い結合親和力を有するモノクローナル抗体を、6~8炭素原子のアームを持つた架橋アガロースビーズ[たとえばアフィゲル<sup>TM</sup>102およびアフィゲル<sup>TM</sup>202、バイオ・ラッド(Bio Rad)、リッチモンド、カリフォルニア]に共有結合させる。精製したネズミIgGモノクローナル抗体は、架橋アガロースのアームの化学構造に依存して、その遊離のカルボキシまたは遊離のアミノ基を介して共有結合することができる(共有結合には通常のカルボジイミド化合物を使用する)。たとえば、約0.15OD単位のIgGタンパクが、このアガロースゲルマトリックスに共有結合することができる。次に、高純度のワサギトロンボモジュリン調製物を、0.02Mトリス-HCl(pH

7.4) および 0.15 M の NaCl の緩衝液で 0.15 OD 単位/μl まで希釈する。次いで、結合したモノクローナル抗-トロンプモジュリン抗体でパツクされたアガロースビーズ 1 容量を、トロンプモジュリン 1 容量と混合し、混合物を緩やかに攪拌しながら一晩インキュベートする。

次いでこのビーズを遠心し、結合したトロンプモジュリン量を、精製したタンパクの E<sub>1</sub> 値 (吸光係数) を 8.8、Mr (分子量) を 75 kd と仮定して、上澄液の A<sub>280</sub> の測定により算出する。見かけ上均質になるまで精製したウシトロンプ (比活性: 2,000 NIH U/μg) を固定化したトロンプモジュリンに対して等モルの計算値量よりわずかに過剰量加える。次いでこのビーズを 30 分 - 1 晩、4℃ でインキュベートする。このインキュベーションの後、ビーズを 0.02 M トリス-HCl (pH 7.4) および 0.15 M の NaCl 緩衝液で 6 - 10 回洗浄し、次いでビーズをこの緩衝液中、4℃ で貯蔵する。

精製したプロテイン C 溶液またはプロテイン C

または活性化プロテイン C に感応性の他のトリペプチドパラニトロアニリド基質を使用して、活性混合物について、活性化したプロテイン C の活性を試験する。

この手法によつて、翻訳後の γ-カルボキシ化修飾が起こったかどうかとは関係なく、プロテイン C について、活性化したプロテイン C 活性の活性化および発現が可能である。しかし、γ-gla が少ないプロテイン C の活性化速度は、翻訳後の修飾を受けたプロテインの活性化速度の約 20% である。もし、発現した産生物が γ-カルボキシグルタメート残基を含有しなければ、活性化インキュベーションの期間は、この比較的低い活性化速度を考慮して延長する。

別法では、見かけ上均質になるまで精製したウシ凝固因子 Xa を利用し、凝固因子 Va (Xa が関与するプロトロンビンからトロンプへの変換に必須であり、かつ活性化プロテイン C 感応性の補助因子である) の不活性化速度を測定することからなる凝固検定法で活性化プロテイン C の活性

含有組織培養培地 1 ml を、パツクされたビーズ 50 μl に加え振盪器上、37℃ で 30 分間インキュベートする。活性化したセリンプロテアーゼへの酵素原の活性化は、通常 1 μg/ml のウシ血清アルブミン (放射線酵素検定グレード、シグマ、セントルイス、ミズーリ) を含有する、種々の生理的 pH およびイオン強度の緩衝液中で容易に起こる。この活性化反応はカルシウムを必要とし、このため、通常、活性化混合物に、最終濃度が 0.005 - 0.025 M になるように CaCl<sub>2</sub> を加える。

インキュベーションの終了時に、遠心によつてビーズを除去し、見かけ上均質になるまで精製した、ヒト抗トロンプ III を加えて残存する遊離のトロンプすべてを失活させる。精製した抗トロンプ III (1 OD 単位/μl) 20 μl を、活性化混合物それぞれ 500 μl に加える。室温で 15 分間インキュベートした後、合成ペプチドパラニトロアニリド (pNA) 基質 H-D-Phe-Pip-Arg-pNA [S-2238、カビービトラム (Kabi-Vitrum)、ストックホルム、スウェーデン]、ま

を測定することができる。HepG-2/pL133 形質転換体からの調整培地について前記の活性化法を行ない、凝固検定によつて証明したとき、該培地は擬一形質転換した HepG-2 細胞 (~125 ng/ml) に比べ ~2 X ないしそれ以上の活性化プロテイン C (~250 ng/ml) を有することがわかった。

CHO-K1-(dhfr<sup>r</sup>)/pL14 形質転換体の培地から単離したプロテイン C を本実施例の方法に従つて活性化し、凝固およびアミドール性 (amidolytic) 検定で試験した。この検定は、プロテイン C が活性であることを明らかにし、そして形質転換した CHO-K1 宿主細胞が実質的な γ-カルボキシラーゼ活性を有していることを示した。プロテイン C のようなビタミン K-依存性セリンプロテアーゼ (これに限定はされない) を含む多数のポリペプチドが、少なくともその生物学的活性の一部に γ-カルボキシ化を必要とし、そしてたとえば HepG-2 および H4 IIEC3 セルライン等、少数のセルラインしか γ-カルボキシ



この技術は、大スケールで大量のプロテインCを活性化するのに適している。大量に活性化しようとするときには、活性化しようとするプロテインCの量に適した大きさのカラムにビーズを詰め、

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図はプラスミドpHC7の制限サイトおよび機能地図、第2図はプラスミドpSV2-HPC8の制限部位および機能地図、第3図はプラスミドpL133の制限サイトおよび機能地図、第4図はプラスミドpL132の制限サイトおよび機能地図、第5図はプラスミドpL141の制限サイトおよび機能地図、第6図はプラスミドpL142の制限サイトおよび機能地図、第7図はプラスミドpMSV-HPCの制限サイトおよび機能地図、第8図はプラスミドpMMT $\Delta$ BPV-HPCの制限サイトおよび機能地図、第9図はプラスミドpL151の制限サイトおよび機能地図、第10図はプラスミドpCZ101の制限サイトおよび機能地図、第11図はプラスミドpCZ10の制限サイトおよび機能地図、第12図はpCZ459の制限サイトおよび機能地図を示すそれぞれ模式図である。

FIG. 2

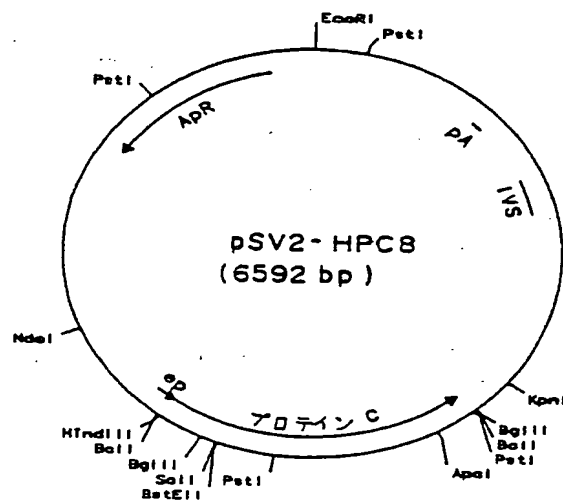


FIG.3

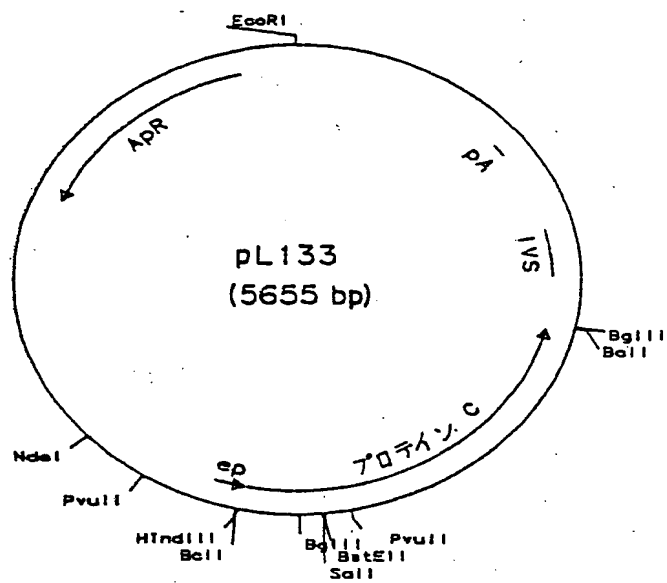


FIG.4

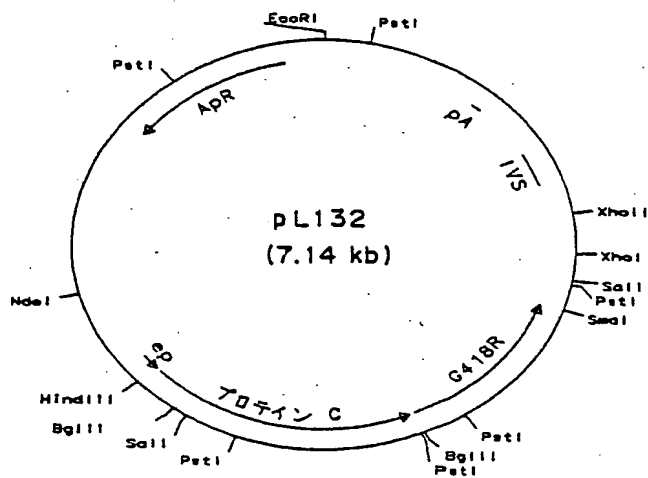


FIG.5

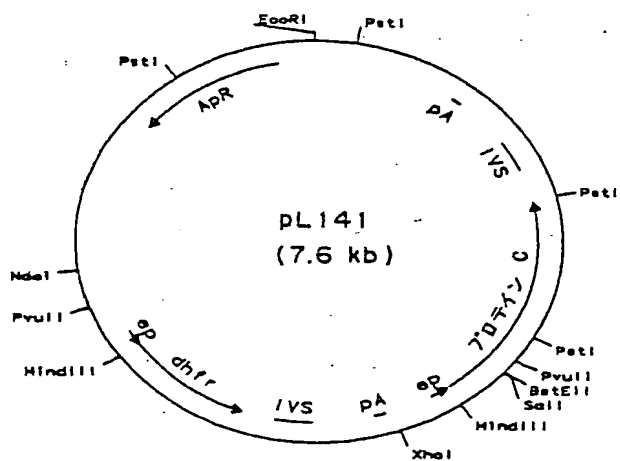


FIG.6

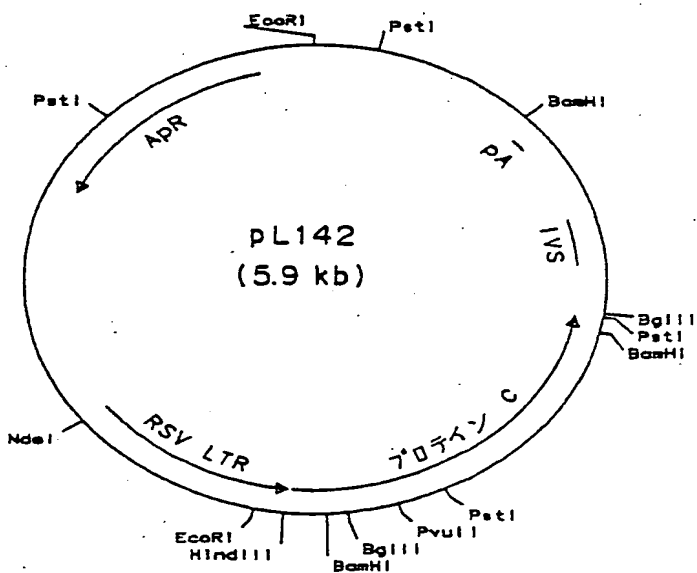


FIG. 7

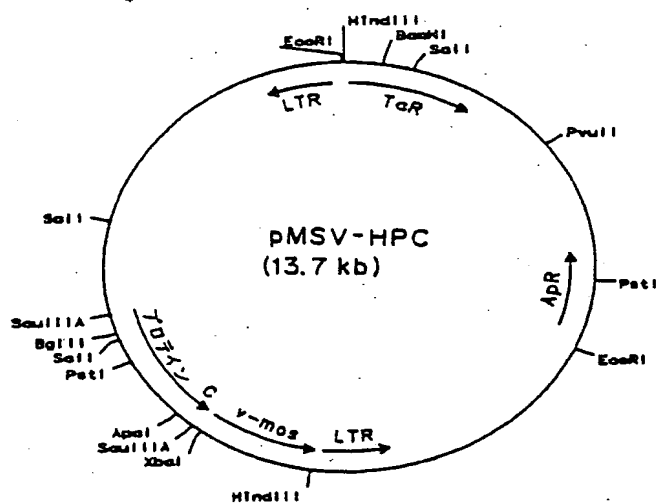


FIG. 8

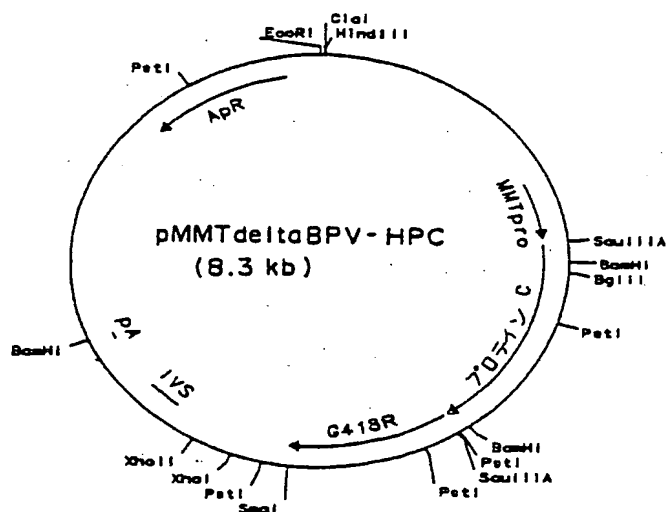


FIG. 9

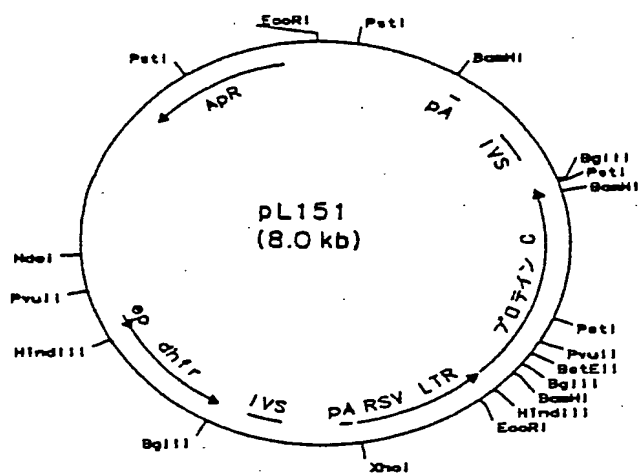


FIG.10

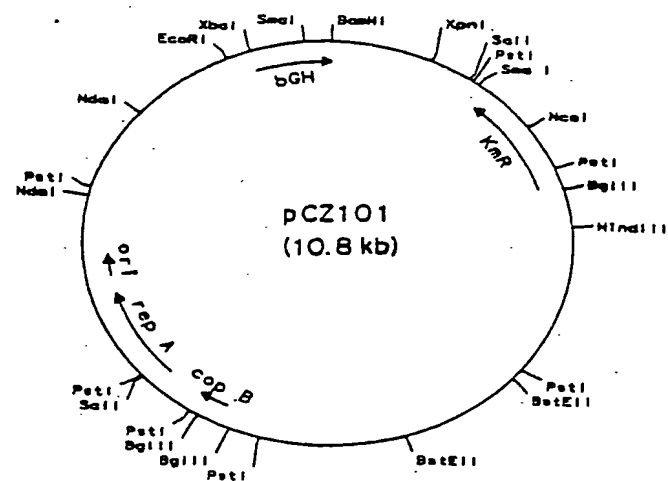
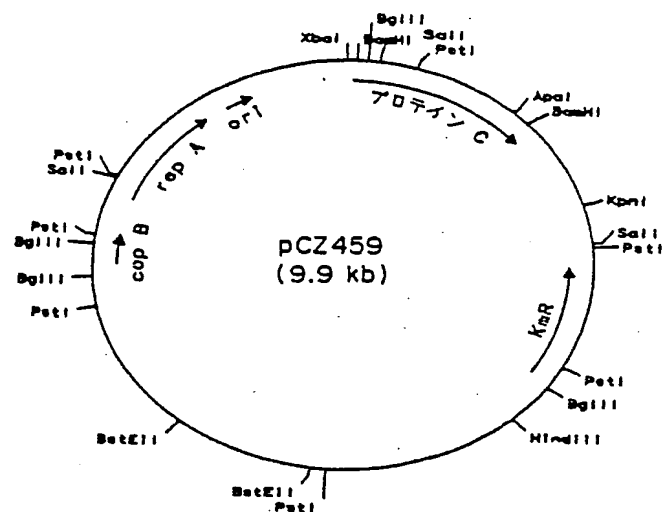


FIG.12



⑤ Int. Cl. <sup>4</sup>

庁内整理番号

6464-4H  
7115-4B  
B - 7115-4B  
7235-4B  
6742-4C

アメリカ合衆国インディアナ46220、インディアナポリ  
ス、ノース・タクシードウ・ストリート6910番

アメリカ合衆国インディアナ46032、カーメル、ペブル・  
ビーチ・ドライブ2110番

アメリカ合衆国インディアナ46208、インディアナポリ  
ス、サンセット・アベニュー4629番

アメリカ合衆国インディアナ46220、インディアナポリ  
ス、ワイマン・コート 6532番

アメリカ合衆国インディアナ46077、ザイオンズヴィレ、  
サウス500、イースト11735番

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**